

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**EFEITOS TÓXICOS DO USO ABUSIVO DE METILFENIDATO
ASSOCIADO À CAFEÍNA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natália Freddo

**Passo Fundo, RS, Brasil
2020**

EFEITOS TÓXICOS DO USO ABUSIVO DE METILFENIDATO ASSOCIADO À CAFEÍNA

Natália Freddo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientador: Luciana Grazziotin Rossato-Grando
Coorientador: Leonardo José Gil Barcellos

Passo Fundo, RS, Brasil
2020

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

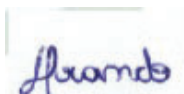
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS TÓXICOS DO USO ABUSIVO DE METILFENIDATO ASSOCIADO
À CAFEÍNA**

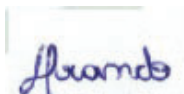
Elaborada por
Natália Freddo

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

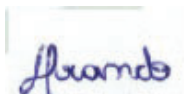
Comissão Examinadora



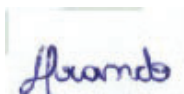
**Luciana Grazziotin Rossato-Grando, Dr. UPF
(Orientador/Presidente)**



**Leonardo José Gil Barcellos, Dr. UPF
(Coorientador)**



Rômulo Pilon Barcelos, Dr. UPF



Carla Denise Bonan, Dr. PUC

**Passo Fundo, RS, Brasil
2020**

CIP – Catalogação na Publicação

F852e Freddo, Natália

Efeitos tóxicos do uso abusivo de metilfenidato
associado à cafeína / Natália Freddo. – 2020.

61 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Grazziotin Rossato-
Grando.

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2020.

1. Metilfenidato. 2. Cafeína. 3. Neurofarmacologia.
4. Toxicologia. I. Rossato-Grando, Luciana Grazziotin,
orientadora. II. Barcellos, Leonardo José Gil, coorientador.
III. Título.

CDU: 615

Catálogo: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues – CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas as quais sou grata, afinal um título de Mestre não se constrói sem a colaboração dos demais. Este trabalho é fruto do empenho incansável de muitas pessoas que dedicaram seu tempo em me orientar e em me ensinar.

Primeiramente, agradeço a minha brilhante orientadora Profe Luciana por ter apostado pela segunda vez em mim. Sou grata a confiança em mim depositada, a paciência e sensibilidade, as oportunidades concedidas, a seriedade, competência e profissionalismo com o qual conduziu nosso trabalho, e acima de tudo a amizade que construímos ao longo destes anos. É um exemplo de dedicação. Sempre muito eficiente e ágil tem todo meu carinho, admiração e respeito.

Agradeço o meu co-orientador Professor Leonardo, que possibilitou a minha vivência no fascinante e encantador universo do *zebrafish* e que com seu jeito querido, justo e honesto de ser conquistou minha admiração. É um exemplo de profissional, cientista e ser humano.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia de Peixes – UPF/FAMV. Su, Mi, Aline, Amandinha, Mateus, Ray, Vitória, Roberta, Vic, Karina, Gessi, Carla, Aloma, Renan, Profe Heloísa e Profe Leo (um líder cinco estrelas), obrigada por todos os ensinamentos, pela oportunidade, pela troca de conhecimentos, pelo ajuda incansável em todas as etapas de laboratório, pelo carinho e por fazerem da rotina do mestrado algo leve, prazeroso e gratificante. Sempre me senti muito bem recebida. Vocês despertaram em mim o amor pelos peixes e com certeza, foram o maior presente que o mestrado proporcionou.

Um agradecimento especial a Su, Mi e Aline que dividiram comigo todas as minhas falhas, angústias, dificuldades. Estiveram presentes nos momentos mais difíceis. Obrigada por me ouvirem, por partilharem o conhecimento, pela amizade, pelos conselhos e pela acolhida desde o início. Tenho muita admiração pelas profissionais que vocês são, cada uma com um jeito único e encantador de ser.

A todos os meus colegas e amigos do mestrado, em especial a Aloma, Simone, Joana, Diorges, Lucas, Gabriela e Ana Paula. A caminhada foi mais alegre e divertida ao lado de vocês.

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Kreutz pelo exemplo, consideração, incentivo e por estar sempre disponível. Em seu nome, agradeço o Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação (PPGBioexp), o qual me oportunizou enorme crescimento pessoal e profissional, e a todos os excelentes Professores do PPGBioexp por fazerem parte da minha caminhada.

Aos funcionários do Curso de Farmácia e do Labe- UPF por serem sempre prestativos: Nádia, Inês, Tiago, Camila, Profe Salua, Alessandra e Luciana. Também meus sinceros agradecimentos a Patrícia, e a Danieli, funcionárias do PPGBioexp e a Farmacêutica Adriana, funcionária do Parque Tecnológico da UPF.

Agradeço a todas as colegas de pesquisa do GFTox – UPF por estarem presentes na realização das atividades de laboratório e por todo auxílio a mim dedicado.

Agradeço a Júlia e o Professor Rômulo por serem nossos parceiros científicos e por inúmeras vezes nos emprestarem os reagentes que tanto necessitávamos.

Agradeço a amiga Farmacêutica Nicole, sempre prestativa e eficiente, e em seu nome estendo meus agradecimentos a Rede de Farmácias São João pela doação de toda Ritalina (metilfenidato) utilizada na pesquisa.

À minha família, em especiais aos meus pais, por me ensinarem a ser um bom ser humano antes de qualquer coisa, pelo estímulo aos estudos e por não medirem esforços para que este sonho fosse possível.

Ao Rada por todo seu amor, paciência, compreensão e incentivo durante todo o percurso. Obrigada por dividir comigo a mais bela e grandiosa construção que existe: a vida a dois.

Agradeço a Dona Marlene, que sempre muito amável, me apoiou de maneira incondicional nesta jornada. Agradeço ainda a Ká e o Samu pelo apoio, carinho e preocupação que desprendem a mim.

A Beta por ser um dos seres humanos mais incríveis e iluminados que já conheci, e por mesmo longe, estar sempre perto. Ao meu avô Ary (*in memoriam*) que nos deixou durante a realização do mestrado, por ter sido o meu maior exemplo e incentivador, por sempre ser o primeiro a aplaudir minhas vitórias e por ter deixado o mundo melhor do que encontrou.

A realização desse trabalho somente foi possível com o apoio financeiro da CAPES/FAPERGS pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço com o coração cheio de amor a todos que fizeram parte desta linda história. Este trabalho é de todos nós! Muito Obrigada!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família em especial ao meu Avô Ary (*in memorian*), ao Rada e seus familiares e ao nosso anjo de quatro patas Marechal. A todos os professores brilhantes que contribuíram para minha formação e sobretudo, aos peixes.

EPIGRAFE

Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 METILFENIDATO.....	19
2.2 CAFEÍNA.....	20
2.3 USO NÃO MÉDICO DOS ESTIMULANTES DO SNC.....	22
2.4 TOXICIDADE DO MTF E CAF.....	24
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO COMO POSSÍVEL MECANISMO TÓXICO DO MTF.....	25
2.6 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS COMO POSSÍVEL MECANISMO DE TOXICIDADE DO MTF.....	28
2.7 ZEBRAFISH.....	29
3. CAPÍTULO 1	31
Abstract	32
Introduction	33
Materials and Methods	34
Results	40
Discussion	45
References	49
4. CONCLUSÕES	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1. Estrutura química do Metilfenidato (MTF).....	19
FIGURA 2. Estrutura química da Cafeína (CAF).....	21
FIGURA 3. Representação esquemática da Cadeia Respiratória Mitocondrial.....	28

3. CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Representação esquemática do Delineamento Experimental.....	35
FIGURA 2. Parâmetros comportamentais dos peixes no Teste do Tanque Novo (NTT) (Distância total percorrida, Tempo gasto na zona superior, Número de cruzamentos, Latência para entrar na zona superior, Ângulo absoluto de virada e Tempo gasto na zona inferior).....	40
FIGURA 3. Parâmetros comportamentais dos peixes no Teste de Preferência Social (PS) (Tempo gasto no segmento próximo aos co-específicos e Tempo gasto no segmento vazio).....	41
FIGURA 4. Efeitos do MTF e da CAF na memória no Teste <i>Y-maze</i> (Tempo gasto no braço novo, Entradas no braço novo, Latência para entrar no braço novo e Distância total).....	42
FIGURA 5. Parâmetros de estresse oxidativo (TBARS, Proteína Carbonil, Óxido Nítrico, Tióis Não Proteicos e Proteína).....	43
FIGURA 6. Parâmetros da Cadeia Respiratória Mitocondrial (Atividade dos complexos I, II-III e IV).....	44

LISTA DE TABELAS**3. CAPÍTULO 1**

TABLE 1: Statistical details of the comparisons made. Significant effects in bold.....	44
--	----

LISTA DE QUADROS

2. REVISÃO DE LITERATURA

QUADRO 1. Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	26
QUADRO 2. Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CES1A1	Carboxilesterase
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5'5-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-cético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FAMV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
FAPERGS	Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g/L	Gramas/litro
GSSG	Glutathiona oxidada
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GSH-Rx	Glutathiona Redutase
GSH	Glutathiona reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferrocianeto de Potássio
Kg	Quilograma
LPO	Lipoperoxidação lipídica
MDA	Malonildialdeído
µg	Microgramas
mg	Miligramas

mg/L	Miligrama/litro
MTF	Metilfenidato
MTF+CAF	Metilfenidato + Cafeína
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
NCAA	<i>National Collegiate Athletic Association</i>
NADH	Nicotinamida adenina Dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
nm	Nanômetros
PS	Preferência Social
SNC	Sistema Nervoso Central
SNGPC	Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TFKm	Fosfato de Potássio Monobásico
TFKd	Fosfato de Potássio Dibásico
TTN	Teste do Tanque Novo
ul	microlitro
ugmol.g ⁻¹	micromol/grama
UPF	Universidade de Passo Fundo
UNM	Uso Não Médico
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

EFEITOS TÓXICOS DO USO ABUSIVO DE METILFENIDATO ASSOCIADO À CAFEÍNA

Autor: Natália Freddo

Orientador: Luciana Grazziotin Rossato-Grando

Coorientador: Leonardo José Gil Barcellos

Passo Fundo, 28 de julho de 2020.

O metilfenidato (MTF) é um psicoestimulante amplamente prescrito para o Tratamento de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), uma vez que diminui a inquietação motora e promove aumento da concentração, atenção e memória. Porém, devido aos seus efeitos estimulantes, o MTF vem sendo utilizado como droga de abuso de fácil acesso, potencializador cognitivo e pode ser encontrado em suplementos dietéticos de forma clandestina, juntamente com outros estimulantes, sendo o mais prevalente a cafeína (CAF). Os efeitos deste uso irregular e abusivo do MTF ainda não estão totalmente elucidados. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos do MTF, utilizado de forma aguda e em doses não terapêuticas, isolado ou associado à CAF, através de ensaios comportamentais, marcadores de estresse oxidativo e parâmetros da cadeia respiratória mitocondrial, utilizando como modelo animal o *zebrafish*. Os peixes foram expostos durante 15 minutos a 3 diferentes doses: MTF 80 (80 mg/L), CAF 150 (150 mg/L) e MTF80+CAF150 (80 mg/L + 150 mg/L). Após a exposição, foram avaliados os comportamentos exploratório, preferência social e a memória. Foram investigados os seguintes mecanismos relacionados às alterações observadas: marcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica, tióis não proteicos, carbonilação proteica), geração de óxido nítrico, nível de proteínas e parâmetros do status energético (atividade dos complexos mitocondriais I, II-III e IV). Neste estudo, nós demonstramos que o MTF utilizado de forma abusiva promove um comportamento antissocial e induz carbonilação de proteínas. Com relação aos efeitos oxidativos, o MTF isolado apresentou um efeito protetor, inibindo a peroxidação lipídica. A CAF utilizada isoladamente promove um aumento das atividades dos complexos respiratórios mitocondriais (II-III e IV) e da geração de óxido nítrico. A associação de MTF e CAF no contexto não terapêutico promove um comportamento ansiogênico e prejuízos de memória. Embora esta associação diminua a peroxidação lipídica, promove aumento na carbonilação proteica, além do aumento das atividades dos complexos respiratórios mitocondriais (II-III e IV). Nossos resultados evidenciam que a exposição não terapêutica do MTF e da CAF tem efeitos relevantes na sociabilização e no comportamento de ansiedade. A associação de MTF e CAF, frequentemente utilizados para melhorar o desempenho cognitivo, de acordo com nosso estudo, de fato, prejudica a memória. Os mecanismos associados aos efeitos observados com esta exposição envolvem lesão proteica, evidenciada pelo aumento da carbonilação proteica, bem como o aumento do metabolismo mitocondrial.

Palavras-chave: Toxicidade. Metilfenidato. Estimulantes. Uso Não Médico.

ABSTRACT

**Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

**TOXIC EFFECTS OF ABUSIVE USE OF METHYLPHENIDATE
ASSOCIATED WITH CAFFEINE**

Author: Natália Freddo
Advisor: Luciana Grazziotin Rossato-Grando
Coadvisor: Leonardo José Gil Barcellos
Passo Fundo, 28 de julho de 2020.

Methylphenidate (MPH) is a psychostimulant widely prescribed for the Treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), since it decreases motor restlessness and promotes increased concentration, attention and memory. However, due to its stimulating effects, MPH has been used as an easily accessible drug of abuse, cognitive enhancer and can be added in dietary supplements, along with other stimulants, the most prevalent being caffeine (CAF). The effects of this irregular and abusive use of MPH are not yet fully understood. The main objective of this work was to evaluate the toxic effects of MPH, used acutely and in non-therapeutic doses, isolated or associated with CAF, through behavioral tests, oxidative stress markers and parameters of the mitochondrial respiratory chain, using zebrafish as an animal model. Fish were exposed for 15 minutes to 3 different doses: MPH 80 (80 mg / L), CAF 150 (150 mg / L) and MPH80 + CAF150 (80 mg / L + 150 mg / L). After exposure, exploratory behavior, social preference and memory were evaluated. The following mechanisms related to the observed changes were investigated: oxidative stress markers (lipid peroxidation, non-protein thiols, protein carbonylation), nitric oxide generation, protein level and energy status parameters (activity of mitochondrial complexes I, II-III and IV). We demonstrated that MPH used in an abusive way promotes antisocial behavior and induces protein carbonylation. Regarding the oxidative effects, isolated MPH had a protective effect, inhibiting lipid peroxidation. CAF used alone promotes an increase in the activities of the mitochondrial respiratory complexes (II-III and IV) and the generation of nitric oxide. The association of MPH and CAF in the non-therapeutic context promotes anxiogenic behavior and memory impairment. Although this association decreases lipid peroxidation, it promotes an increase in protein carbonylation, in addition to an increase in the activities of mitochondrial respiratory complexes (II-III and IV). Our results show that the non-therapeutic exposure of MPH and CAF has relevant effects on sociability and anxiety behavior. The association impairs memory. Mechanisms related to these changes are related to protein lesion, as evidenced by increases in protein carbonylation, as well as increases in mitochondrial metabolism.

Keywords: Toxicity. Methylphenidate. Stimulants. Non-Medical Use.

1. INTRODUÇÃO

O metilfenidato (MTF) é um psicoestimulante amplamente prescrito para o tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (1). Entende-se como aplicação terapêutica do MTF a sua propriedade de diminuir a inquietação motora e de aumentar a concentração, atenção e memória (2). Devido a estas propriedades, pessoas saudáveis que buscam os efeitos do medicamento para melhora das funções cognitivas e aumento do estado de vigília, passaram a usá-lo de forma esporádica, em um contexto não terapêutico (Uso Não Médico) (UNM). Frequentemente, o MTF é associado a outros estimulantes que potencializam as atividades perceptivo-sensorial e motora como a Cafeína (CAF) (3,4). Considerando a sua estrutura química de derivado anfetamínico, o MTF é utilizado como droga de abuso devido aos seus efeitos estimulantes, porém de mais fácil acesso do que as anfetaminas (5).

O MTF é um dos medicamentos mais frequentemente detectados no teste de *doping* de acordo com a *World Anti-Doping Agency* (WADA) (3,4). O fato do MTF aparecer como um dos estimulantes mais amplamente utilizados por atletas pode ser devido a sua adição irregular em suplementos dietéticos, ao invés de ser consumido como medicação (6). No Brasil, a presença irregular de MTF foi constatada em amostras de suplementos alimentares apreendidas pela Polícia Federal. Em um total de 108 amostras o MTF esteve presente em 10% das amostras analisadas. Além disso, as amostras apreendidas que apresentaram resultados positivos para MTF também continham outros estimulantes, sendo o mais prevalente a cafeína (6). Esses achados destacam a preocupação com a composição destes suplementos adulterados clandestinamente e representam um sério risco para a saúde dos usuários (6–8).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto das alterações comportamentais e toxicológicas da exposição aguda a doses não terapêuticas de MTF isolado e associado com a CAF. Para isso, utilizamos o *zebrafish* como modelo animal, uma vez que apresentam importante homologia com os mamíferos (9).

Essa dissertação compreende, além da introdução, uma revisão de literatura abordando o UNM de MTF e CAF e dados sobre os parâmetros de estresse oxidativo e marcadores do *status* energético mitocondrial. Os resultados obtidos estão apresentados no capítulo 1 em forma de artigo científico intitulado **Stimulants cocktail: methylphenidate plus caffeine impairs memory and cognition and alters mitochondrial and oxidative status**, o qual foi aceito no periódico *Progress in*

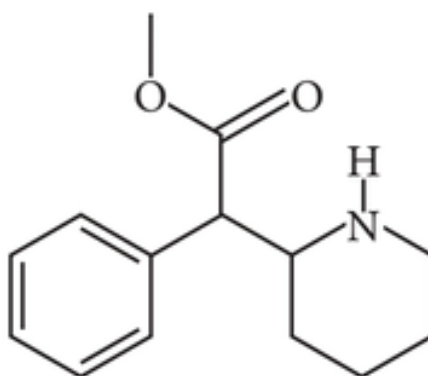
Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry. Por fim apresentamos as conclusões do estudo e as considerações finais/perspectivas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METILFENIDATO

O MTF é um psicoestimulante derivado das anfetaminas (Figura 1) e é considerado um estimulante do SNC (10,11). O mecanismo de ação do MTF se dá pela inibição da recaptação de noradrenalina e dopamina, resultando em um aumento dessas catecolaminas na fenda sináptica, causando uma excitação e uma maior interação com seus receptores alfa e beta adrenérgicos (12,13). A dopamina modula o desempenho cognitivo em partes, via receptores D1 e D2 no córtex pré-frontal (14). No entanto, diversas evidências também sugerem que a modulação dopaminérgica sobre a cognição conta com uma múltipla rede cortical, apesar do real papel da dopamina nessa rede ser ainda pouco conhecido (15,16). A biotransformação do MTF se dá pela ação da carboxilesterase (CES1A1) de forma rápida e extensiva (17). As concentrações plasmáticas máximas são obtidas em média 1 a 2 horas após a administração via oral. Apresenta meia vida plasmática de 2 horas, 78 a 97% da dose oral é excretada pela urina e 1 a 3% nas fezes, em 48 a 96 horas. Menos de 1% de MTF inalterado é excretado pela urina e a maior parte (cerca de 80%) é excretada na forma de ácido ritalínico que tem pouca ou nenhuma atividade farmacológica (17).

Figura 1 - Estrutura química do MTF.



Fonte: (13).

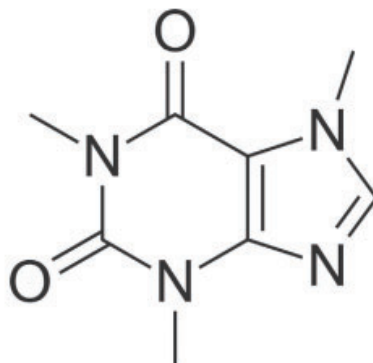
A Ritalina® é a formulação comercial mais prescrita entre as disponíveis de MTF no Brasil e possui como substância ativa o cloridrato de MTF. É indicada principalmente para tratamento de TDAH, uma vez que melhora a atenção e a concentração e reduz o comportamento impulsivo (18). Além disso, em crianças com o transtorno, observa-se que o fármaco atua melhorando o funcionamento em vários domínios, como o relacionamento com pares, a interação social e o desempenho acadêmico (19) além de melhorar também algumas funções cognitivas, como atenção, vigilância, memória operacional e tarefas de alternância (20). Suas doses variam de 10-80mg/dia, sendo que crianças não devem ultrapassar a dose de 60mg/dia e adultos 80mg/dia (17,21).

2.2 CAFEÍNA

A CAF (1,3,7-trimetilxantina) (Figura 2) é um alcalóide estimulante do SNC (22), amplamente consumida uma vez que está presente em várias bebidas como chás, refrigerantes, cafés, suplementos e medicamentos (23,24). Sua principal ação farmacológica é por meio do antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina, ocasionando o bloqueio dos mesmos, provocando acúmulo de neurotransmissores no meio extracelular (23,25).

Após a ingestão de CAF ocorre uma rápida absorção no trato gastrointestinal e ela é transportada por fluxo sanguíneo através da veia porta hepática (22–24). Cerca de 95% do seu metabolismo ocorre nos hepatócitos, via Citocromo P450 (CYP450) e principalmente via isoenzima CYP1A2, ocasionando sua desmetilação e transformando-a em teobromina, paraxantina e teofilina (24,26). A CAF e seus metabólitos podem apresentar efeitos em diferentes tecidos como SNC, músculo esquelético, sistema cardiovascular, renal e pulmonar (22).

Figura 2 - Estrutura química da CAF.



Fonte: (27).

Os efeitos biológicos da cafeína estão relacionados em três pontos modulatórios principais (28): efeitos antagônicos não seletivos nos receptores A1 e A2 da adenosina (29), inibição da fosfodiesterase e mobilização de cálcio (30,31). A ativação dos receptores de adenosina A1 inibe fortemente a liberação de acetilcolina nos neurônios do hipocampo e a acetilcolina demonstrou ser importante para o armazenamento da memória (32). Com base nesses achados e o fato de que há um declínio progressivo da acetilcolina cerebral à medida que a idade avança, alguns estudos consideram que a inibição de receptores de adenosina A1 seja o principal mecanismo envolvido no comprometimento da memória (29,33). Os receptores de adenosina são subdivididos em A1R (acoplado à proteína Gi), A2aR e A2bR (acoplado à proteína Gs) e A3R. No cérebro, os alvos da CAF, em doses não tóxicas, são os receptores A1R e A2aR. Quando Gi estiver bloqueado por baixas doses de CAF, não há inibição da atividade da Adenil ciclase, ocasionando um acúmulo de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPC) e levando a uma diminuição da produção das citocinas. Contudo, como a CAF é um antagonista inespecífico de AR, em altas concentrações, ocorre bloqueio dos receptores A2R, levando a um efeito oposto, diminuindo a produção de AMPC e consequentemente, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (28,29).

A CAF apresenta um efeito bifásico dose-dependente, ou seja, em altas doses (entre 500 a 600 mg/dia para adultos) (34) provoca aumento da ansiedade e doses pequenas/terapêuticas (até 400 mg/dia para indivíduos adultos com cerca de 70 Kg) (34) mostram-se ansiolíticas e são capazes de melhorar a memória e o desempenho na realização de tarefas simples (35–37). Já os seus efeitos em tarefas mais complexas são difíceis de avaliar e provavelmente envolvem interações entre a CAF e outras variáveis que aumentam/melhoram a atenção (38). Efeitos benéficos da cafeína já foram relatados

no estado de alerta e atenção constante, codificação e percepção, enquanto achados sobre memória são bastante heterogêneos (32,39). Já foi evidenciado o papel neuroprotetor da CAF em doenças degenerativas com Parkinson e Alzheimer, uma vez que a CAF diminuiu a deterioração motora e o declínio mental e ainda indicou melhora na memória a longo prazo e poder de reter informações em caráter definitivo(40).

Ao contrário dos efeitos encontrados na ingestão normal de CAF, existem dados que demonstram efeitos negativos quando quantidades muito grandes de CAF são consumidas, ocasionando aumento da ansiedade e prejuízo do sono (38). Os efeitos da cafeína na ativação cerebral, avaliados em estudos de neuroimagem, são semelhantes aos do MTF, embora as substâncias diferem em seus perfis farmacológicos (32).

. Os efeitos antagônicos não seletivos da CAF nos receptores A1 e A2A da adenosina podem ser protetores pois os receptores de adenosina podem controlar o metabolismo da glutatona e a formação de radicais livres (41), eliminando as Espécies Reativas do Oxigênio (EROS), particularmente o radical hidroxila (42), atuando como antioxidante (43). A adenosina pode ser liberada para o espaço extracelular mediante vários estímulos, entre eles, a ativação de receptores glutamatérgicos (44). Além disso, a adenosina apresenta importante papel neuromodulador e comportamental, principalmente nos receptores A1, nos quais há modulação de respostas relacionadas à ansiedade (45).

2.3 USO NÃO MÉDICO DOS ESTIMULANTES DO SNC

O consumo de MTF e anfetaminas aumentaram 35,5% do ano de 2008 para 2013, e as maiores taxas de aumento são observadas entre adolescentes e adultos (46). Atualmente, o Brasil é o segundo maior consumidor de MTF, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (47). O MTF é um medicamento psicotrópico, cuja comercialização é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), encontra-se na lista de medicamentos A3 e sua dispensação exige receita de controle especial de cor amarela (48). Por esse estimulante aumentar a concentração e induzir euforia, ele está associado ao abuso e desvio de uso (49). A *Food and Drug Administration* (FDA) define abuso de medicamentos prescritos como “o intencional, não terapêutico uso de um medicamento ou substância, mesmo que uma vez, para alcançar um efeito psicológico ou fisiológico desejável”(50). O UNM caracteriza-se quando um medicamento que exige prescrição é utilizado sem indicação médica ou de maneira diferente da prescrita (51,52).

Os praticantes de exercícios físicos de alto rendimento, a fim de otimizar seu desempenho físico, aumentar a resistência e melhorar a performance, utilizam suplementos alimentares dos mais variados tipos (53). O MTF é um dos estimulantes mais prevalentes detectados no teste de doping esportivo e considerando a sua relevância toxicológica, o mesmo foi incluído na lista de substâncias controladas no esporte (4,54). Os atletas afirmam que o MTF aumenta a resistência, elimina a fadiga e a sonolência, aumentando o estado de vigília (55,56). Além deste uso intencional e irregular do MTF, sua prevalência no teste de doping pode ainda estar relacionada a sua adição de forma clandestina em suplementos dietéticos utilizados por atletas rotineiramente (6).

Além dos efeitos no desempenho físico em exercícios aeróbicos devido ao aumento da neurotransmissão de dopamina (57,58), o MTF altera a conectividade cerebral (59). Com ações semelhantes à cocaína e as anfetaminas, quando utilizado de forma não terapêutica, induz aumentos de dopamina nas vias cerebrais, o mesmo efeito observado quando se utiliza drogas de abuso (60,61).

O UNM do MTF para neuroaprimoramento, a fim de aumentar o desempenho em avaliações, permanecer mais tempo acordado e aumentar a capacidade de aprendizagem e memória, tornou o doping uma prática que extrapolou o ambiente esportivo (62). A prevalência estimada do MTF para neuroaprimoramento atinge 5 a 7% dos universitários norte-americanos (63,64). Um estudo crônico utilizando MTF oral evidenciou comprometimento no reconhecimento e na memória espacial em ratos adultos (65), o mesmo já observado em estudos que utilizavam metanfetamina (66). Além disso, sabe-se que a administração crônica de MTF pode resultar em sensibilização comportamental e déficits cognitivos, quando utilizados por indivíduos que não possuem diagnóstico de TDAH (52,67).

A CAF, devido aos seus efeitos ergogênicos, é frequentemente utilizada na prática esportiva, uma vez que ela suprime a dor aumentando as β -endorfinas, auxilia na mobilização do cálcio para promover o aumento da contração muscular e ainda recruta os ácidos graxos para liberar energia (diminui a dependência do glicogênio), aumenta a termogênese e a vigilância durante tarefas de resistência (53,68). Os suplementos alimentares à base de CAF devem atender os seguintes requisitos: o produto deve fornecer entre 210 e 420mg de cafeína na porção e a mesma deve apresentar teor mínimo de 98,5% de 1,3,7- trimetilxantina, calculada sobre a base anidra (34,69,70). Porém, na maioria dos casos a dosagem encontrada em suplementos alimentares ultrapassa esse intervalo, ou seja, muitos suplementos analisados chegam ter até 2000 mg de cafeína em sua

composição, o que significa um alto risco para a saúde, podendo ocasionar sintomas como vômitos, náuseas, taquicardia, hipertensão grave, arritmia e até mesmo convulsões (71). Além disso, quando a CAF for utilizada em associação com alcaloides de efedrina e anfetaminas, principalmente no contexto da prática de exercícios vigorosos e exaustivos pode aumentar o risco de ocorrência de reações como: infarto agudo do miocárdio, Acidente Vascular Cerebral (AVC) e crise hipertensiva (72,73).

A CAF também pode ser perigosa quando utilizada em altas doses e sem a devida indicação médica, principalmente quando combinada a outros estimulantes, uma vez que ela apresenta um efeito bifásico: em pequenas doses ela diminui o comportamento ansioso, já em doses altas ela apresenta aumento dos níveis de ansiedade (36,37). Além disso, já foi descrito o duplo efeito da CAF na memória, causando melhora da memória em doses baixas e comprometimento em doses mais altas (36). Desta forma, cabe ressaltar que o UNM do MTF associado ou não com a CAF configura-se como um problema de saúde pública e desta forma é necessário desenvolver ferramentas de detecção do UNM destinadas a mitigar riscos e impedir o desvio dos medicamentos estimulantes na prática clínica (52).

2.4 TOXICIDADE DO MTF E CAF

O UNM do MTF pode ter como efeito imediato o aumento do foco e da concentração, mas a longo prazo pode causar supressão do crescimento, aumento da pressão sanguínea, episódios psicóticos, entre outros sintomas (74). Além disso, o seu consumo aumenta os riscos de problemas do coração e pode levar a um quadro de arritmia cardíaca (74). Apresenta tolerância rápida, dependência e risco de overdose fatal, principalmente quando utilizado em combinação com outras substâncias estimulantes (74). Evidências apontam que, tratando-se de um derivado anfetamínico, o MTF apresenta também um risco potencial de abuso (74,75).

O crescente uso prescrito e abusivo, além do descarte incorreto do MTF, leva à contaminação de ambientes aquáticos por resíduos do medicamento (76). E, embora muitos fármacos sejam projetados para modularem a fisiologia e o comportamento em humanos, outros organismos podem sofrer alterações fisiológicas e comportamentais quando expostos a esses compostos, o que aumenta a preocupação em relação aos impactos causados por fármacos em espécies aquáticas (76,77). Os efeitos deletérios

agudos da contaminação residual da água por MTF em *zebrafish* já foram evidenciados por nosso grupo de pesquisa. Esta exposição prejudicou a resposta neuroendócrina ao stress e alterou o comportamento dos peixes, pois foi observado um significativo aumento nos níveis de cortisol na ausência de agentes estressores adicionais e os peixes apresentaram comportamento ansiogênico. Já os peixes submetidos a estresse prévio apresentaram comportamento ansiolítico (78). Além disso, recentemente demonstramos que peixes expostos cronicamente a concentrações ambientalmente relevantes de MTF apresentaram comportamento social prejudicado na dose mais alta, pois permaneceram menos tempo no segmento próximo aos coespecíficos (79). Tal comportamento pode ser interpretado como um comportamento antissocial, visto que o *zebrafish* é uma espécie altamente sociável com uma forte tendência a viver em cardumes (80,81).

A CAF é um dos estimulantes mais conhecidos e seu consumo é permitido pela WADA e pelo *National Collegiate Athletic Association* (NCAA) (82) em concentrações estabelecidas (71,83), ou seja o nível urinário máximo permitido é 15 µg/mL o que resulta em aproximadamente 800 mg (82). No entanto, a CAF pode ser tóxica quando consumida em doses elevadas e particularmente em associação com outros estimulantes, o que é muito comum em suplementos (84,85). Dentre os efeitos adversos do uso prolongado de CAF em doses terapêuticas, incluem interrupção dos padrões de sono, hipertensão, dependência fisiológica, tremores, ansiedade, desconforto gastrointestinal e exacerbação de doenças psiquiátricas subjacentes (86,87). Ao se tratar de sobredosagem da CAF, os efeitos são ainda mais severos, podendo resultar em arritmia, infarto agudo do miocárdio e cardiotoxicidade severa (88).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO COMO POSSÍVEL MECANISMO TÓXICO DO MTF

Radicais livres compreendem toda estrutura química capaz de apresentar orbitais contendo um ou mais elétrons desemparelhados e são continuamente (89) produzidos como parte de processos metabólicos e atuam como sinalizadores fisiológicos no organismo (90). Embora a fisiologia celular normal envolva a contínua produção de radicais livres, principalmente derivados da cadeia respiratória mitocondrial, só teremos uma condição de estresse oxidativo quando a produção desses radicais livres for maior que a capacidade antioxidante, ou seja, é o seu excesso que implica em um balanço

desfavorável e denomina-se estresse oxidativo (89). Para manter a produção de radicais livres em níveis que não tragam prejuízos para a homeostasia celular, o organismo lança mão de alguns sistemas de defesas (91), dentre elas temos as defesas enzimáticas (Quadro 1) e não enzimáticas (Quadro 2).

Quadro 1 – Defesas Antioxidantes Enzimáticas

Defesas Enzimáticas	Superóxido Dismutase (SOD)	Catalase (CAT)	Glutationa Peroxidase (GSH-Px) e Glutationa Redutase (GSH-Rx)
	Remove o radical superóxido (O_2^-), o qual é um radical livre muito reativo, formado pela redução do oxigênio molecular (92).	Catalisa a decomposição de $2H_2O_2$ em duas moléculas de água e uma de oxigênio (92).	A GSH-Px catalisa a reação de vários hidroperóxidos, através da sua redução à água com oxidação da glutathiona reduzida (GSH) e com isso protege a célula do dano oxidativo. A GSH-Rx completa a ação da GSH-Px por converter a glutathiona oxidada em sua forma reduzida (91).

Fonte: o autor (2020).

Quadro 2 – Marcadores Não Enzimáticos de stress oxidativo

Marcadores Não Enzimáticos	Peroxidação Lipídica	Tióis Não Proteicos	Óxido Nítrico	Proteína Carbonil
	Aumento da oxidação dos ácidos graxos presentes nos fosfolípidios de membranas biológicas por ação de EROS (91).	Marcadores antioxidantes que indicam o estado redox da célula e são monitorados pelos níveis de glutathiona (93).	Mensageiro intracelular com capacidade vasodilatadora cerebral que atua na memória e no aprendizado (94).	Marcador de oxidação, relativamente difícil de ser induzida, podendo portanto indicar um estresse oxidativo mais grave (95).

Fonte: o autor (2020).

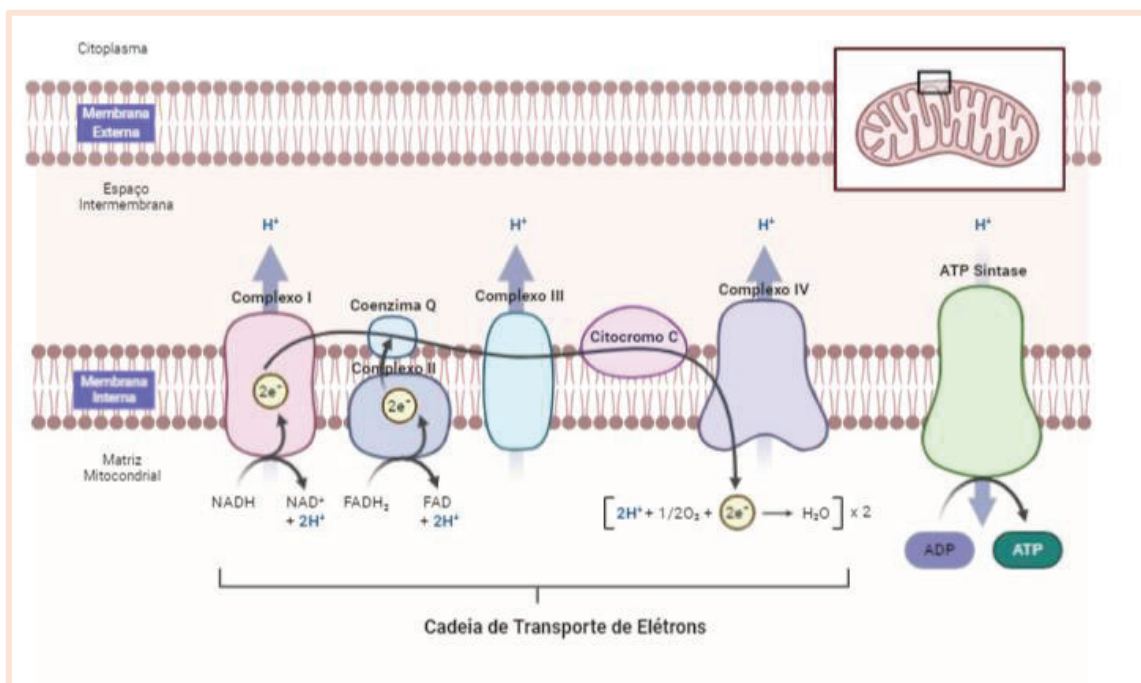
Já foi descrito que o MTF e a CAF modulam marcadores de estresse oxidativo (96,97). O estresse oxidativo é conhecido por estar envolvido na etiologia de processos neurodegenerativos e por ocasionar neurotoxicidade (98). O acúmulo de proteínas carboniladas por exemplo pode levar a uma lesão tecidual (99) e a diminuição de óxido nítrico, importante neurotransmissor, pode apresentar efeitos deletérios acentuados na memória e na aprendizagem (100). Um estudo foi realizado com quarenta ratos machos adultos, os quais foram divididos em 5 grupos e tratados com doses diferentes de MTF, durante 21 dias. Ao término do estudo, pode-se constatar que o MTF em todas as doses aumentou acentuadamente a peroxidação lipídica e o nível de Glutationa Oxidada (GSSG), evidenciando que o tratamento crônico com altas doses (10 e 20mg/Kg) de MTF pode induzir estresse oxidativo em ratos adultos (96). Outro estudo com ratos jovens tratados com MTF de forma aguda e crônica apresentaram alterações nos parâmetros de estresse oxidativo. Na exposição crônica (durante 28 dias – 10 mg/Kg) houve um aumento dos níveis de lipoperoxidação lipídica e formação de proteínas carboniladas em regiões específicas do cérebro dos ratos, já na exposição aguda apenas a dose mais alta (10 mg/Kg) MTF aumentou a peroxidação lipídica no hipocampo (101).

A CAF estimula a atividade neural através de uma maior emissão de noradrenalina (39) e, por sua vez possui uma relação de maneira dependente da dose, podendo apresentar efeitos antioxidantes, inibindo a peroxidação lipídica, prevenindo déficits de memória (102) e diminuindo as EROS em doses recomendadas (103,104). Por outro lado, em altas doses (5 mg/Kg de peso corporal) a CAF pode ocasionar danos oxidativos aos lipídios e inibição das enzimas antioxidantes como SOD e GSH-Px (105,106). Em um estudo realizado com ratos submetidos a exposição à CAF, houve um aumento significativo nos níveis de EROS e de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), impondo efeitos deletérios sobre o estado redox (106). Pouco se sabe dos efeitos de altos níveis de CAF sobre estresse oxidativo tanto no uso crônico quanto agudamente, por esta razão mais estudos são necessários, a fim de desvendar os reais danos ocasionados por altas doses de CAF.

2.6 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS COMO POSSÍVEL MECANISMO DE TOXICIDADE DO MTF

A mitocôndria é uma organela intracelular existente na maioria das células eucarióticas, a qual desempenha um importante papel na produção de Adenosina trifosfato (ATP) celular (107). Além disso, está envolvida na homeostasia celular, na sinalização, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lipídios, colesterol, esteroides e nucleotídeos. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético, nomeadamente, β -oxidação dos ácidos graxos, Ciclo da Ureia e na via final de produção de ATP da cadeia respiratória (108). Os componentes da cadeia respiratória mitocondrial que transportam elétrons, localizam-se na membrana interna da mitocôndria sob a forma de quatro complexos enzimáticos, o Complexo I (NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) Desidrogenase), o Complexo II (Succinato Desidrogenase), o Complexo III (Citocromo C Oxirredutase) e Complexo IV (Citocromo Oxidase) (107,108). A cadeia respiratória mitocondrial (Figura 3) possui ainda dois transportadores de elétrons, a Ubiquinona e o Citocromo C (107).

Figura 3 – Representação esquemática da Cadeia Respiratória Mitocondrial.



Fonte: BioRender (2020).

A mitocôndria é a principal fonte intracelular geradora de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio (107).

O MTF parece estar envolvido nas alterações mitocondriais, uma vez que em ratos jovens, o uso crônico de doses farmacológicas de MTF aumentou a atividade enzimática da cadeia respiratória mitocondrial no cérebro, avaliada pelo consumo da glicose. Neste estudo o objetivo foi medir as atividades dos complexos II e IV da cadeia respiratória e verificar os locais em que a succinato desidrogenase era ativada. Tal exposição crônica fez com que a succinato desidrogenase fosse ativada no cerebelo, no córtex pré-frontal e estriado, não sofrendo alteração no hipocampo e no córtex cerebral. Já a atividade do complexo II foi aumentada no cerebelo e no córtex pré-frontal, enquanto a atividade do complexo IV sofreu aumento apenas no cerebelo, no hipocampo e no córtex estriado. Esses dados sugerem que a exposição crônica ao MTF em ratos jovens aumenta enzimas mitocondriais envolvidas no metabolismo cerebral (109).

Alguns estudos demonstram as propriedades antioxidantes da CAF sob a bioenergética mitocondrial, uma vez que ela ocasiona a dissociação do gradiente de prótons (110), aumento do metabolismo e a atividade dos complexos e a função mitocondrial (35,111). Tais efeitos da CAF podem estar relacionados ao antagonismo de receptores purinérgicos acoplados à proteína G, como P2Y (112), os quais estão envolvidos na captação do cálcio mitocondrial, ou seja, esse possível efeito antagônico da CAF resulta em uma menor captação de cálcio, fechamento dos poros de transição e consequente estimulação da cadeia respiratória (113,114).

2.8 ZEBRAFISH

Os peixes *Danio rerio*, conhecidos como *zebrafish*, Paulistinha ou peixe-zebra, são pequenos peixes vertebrados, teleósteos de água doce, pertencentes à família *Cyprinidae* (80,115). Originários da Índia, Bangladesh e Nepal, seu habitat natural é caracterizado pelo clima de monções, por regiões alagadiças, de baixa correnteza, e presença de vegetações aquáticas (80). O seu rápido desenvolvimento, facilidade de manutenção, disponibilidade de aquisição e aplicabilidade, além da importante relação translacional com o ser humano são algumas vantagens deste organismo (116) e por estas razões foram escolhidos como organismo modelo neste trabalho.

O *zebrafish* vem substituindo os roedores como modelo animal uma vez que crescem rapidamente, a maioria dos órgãos podem ser estudados nos primeiros dias de vida e ainda um único par de zebra adulto pode gerar de 100 a 200 descendentes por reprodução. Além disso, o *zebrafish* pode absorver prontamente produtos químicos da água em quantidades muito baixas, como em microgramas (μg) e ainda, é possível identificar fármacos e seus efeitos em um período de tempo relativamente curto (117). É evidente a possibilidade de estabelecer uma relação entre este modelo animal e a espécie humana, uma vez que o genoma do *zebrafish* foi sequenciado e o mesmo apresentou homologia sintênica de 70% ao genoma humano (118). Por estas razões o *zebrafish* está sendo estabelecido como modelo genético e fisiológico para processos específicos de vertebrados, possibilitando a compreensão de muitas doenças (119).

Em um estudo, foi evidenciado que o peixe-zebra tratado cronicamente com uma dose aguda moderada (50 mg / L) de CAF apresenta bom desempenho em tarefas cognitivas. No entanto, os autores sugerem que o uso contínuo de altas doses (100 mg / L) de cafeína causa prejuízo cognitivo, ou seja, o animal não discrimina um novo objeto, avaliado por meio do Teste de Discriminação de Objetos (120). Vale ressaltar ainda, que como a CAF tem um efeito dose-dependente e levando em consideração a superfície corporal do peixe-zebra, doses acima de 85 mg / L em regime de exposição aguda provocam alteração comportamental e ansiedade nos animais expostos (121).

3 CAPÍTULO 1

Stimulants cocktail: methylphenidate plus caffeine impairs memory and cognition and alters mitochondrial and oxidative status

Natália Freddo¹, Suelen Mendonça Soares², Milena Fortuna², Aline Pompermaier¹,
Amanda Carolina Cole Varela³, Victoria Costa Maffi³, Mateus Timbola Mozzato³,
Heloísa Helena de Alcantara Barcellos^{2,3}, Gessi Koakoski³, Leonardo José Gil
Barcellos^{1,2,3}, Luciana Grazziotin Rossato-Grando*¹

(Artigo aceito ao periódico *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* – 2020)

¹Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: rossatoluciana@upf.br

Tel: 54 9 99269220

Abstract

Methylphenidate (MPH) is a psychostimulant widely misused to increase wakefulness by drivers and students. Also, MPH can be found in dietary supplements in a clandestine manner aiming to burst performance of physical exercise practitioners. The abusive use of high doses of caffeine (CAF) in these contexts is equally already known. Here, we demonstrate the behavioral, oxidative and mitochondrial effects after acute exposure to high doses of MPH (80 mg/L) and CAF (150 mg/L), alone or associated (80 mg/L + 150 mg/L, respectively). We used zebrafish as animal model due to its high translational relevance. We evaluated the behavioral effects using the Novel Tank Test (NTT), Social Preference Test (SPT) and Y-maze Task and analyzed biomarkers of oxidative stress and activity of mitochondrial respiratory chain complexes. MPH alone induced antisocial behavior. MPH inhibited lipid peroxidation. The association of MPH + CAF presented memory impairment and anxiogenic behavior. In oxidative status, it inhibited lipid peroxidation, increased protein carbonylation and mitochondrial complex II, III and IV activity. Our results demonstrate that MPH and CAF alone negatively impact the typical behavioral of zebrafish. When associated, changes in cognition, memory, oxidative and mitochondrial status are more relevant.

Keywords: Toxicity. Stimulants. Cognition. Methylphenidate. Caffeine. Memory.

1. Introduction

Methylphenidate (MPH) is a psychostimulant that improves attention, concentration and reduces impulsive behavior in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) (CHALLMAN; LIPSKY, 2000; LEONARD et al., 2004). Due to these effects, its nonmedical use is explored in order to promote increased cognitive function, productivity and performance (FARAONE et al., 2020). It is also used as a drug of abuse due to its amphetamine-like effects with easier access (MAIER et al., 2013).

MPH is one of the most frequently detected drug in the doping test according to the World Anti-Doping Agency (WADA) (WADA, 2018). The fact that MPH appears as one of the most widely used stimulants by athletes may be due to its addition in some dietary supplements, instead of being consumed as medication. The irregular presence of MPH is frequently seen in samples of seized dietary supplements. Generally when they present positive results for MPH, they also present other stimulants, the most prevalent being high-dose caffeine (CAF) (SANTOS et al., 2018).

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is a stimulant of the Central Nervous System (CNS) (TUNNICLIFFE et al., 2008) with high consumption mainly by practitioners of high-performance physical activities and in order to improve wakefulness by students and workers (GURLEY; STEELMAN; THOMAS, 2014; NEVES; CALDAS, 2017). However, it can be toxic when consumed in high doses and particular in combination with other stimulants, which is very common in dietary supplements (BLOOMER et al., 2013; VENHUIS et al., 2014).

Chronic use of high doses of MPH can cause oxidative stress in rats, evidenced by the increase in lipid lipoperoxidation and oxidized glutathione (MOTAGHINEJAD; MOTEVALIAN; SHABAD, 2015). In addition, the chronic use of pharmacological doses of MPH increases mitochondrial enzymes involved in brain metabolism (FAGUNDES et al., 2010). Studies show that chronic exposure to different doses of CAF can damage and significantly increase mitochondrial function, in a dose dependent manner (ABDELKADER et al., 2013; RAH et al., 2017; SAIKI et al., 2011), increase apoptosis (RAH et al., 2017) and alters oxidative status in different species (BALDISSERA et al., 2019; DE CARVALHO et al., 2019; SILVA et al., 2018). However, effects of MPH + CAF abusive use remains unknown.

In this context, here we tested the hypotheses that MPH, especially when associated with high doses of CAF, cause toxic effects in humans and that oxidative stress

and mitochondrial impairment might be related to its mechanisms. The *Danio rerio* fish were chosen as a model organism, considering the relationship between this animal model and the human species since zebrafish genome shows 70% homology to the human genome (HOWE et al., 2013). Additionally, the basic structure of the central nervous system in zebrafish, and other teleosts has all the major domains found in the mammalian brain with the same modulatory neurotransmitters (MAXIMINO; HERCULANO, 2010; PANULA et al., 2010).

2. Materials and Methods

2.1. Study strategy

To evaluate the effects of MPH and its association with CAF, we exposed different groups of zebrafish to following concentrations: to MPH 80 (80 mg/L), CAF 150 (150 mg/L) or MPH80+CAF150 (80 mg/L + 150 mg/L), which were selected according to those previously detected in food supplements (BRASIL; ANVISA, 2018; EFSA, 2011; FDFW, 2016; SANTOS et al., 2018). We converted doses frequently used in an abusive context to concentrations expressed in mg/L dissolving the selected dose in the tank. Considering there is a lack of knowledge about absorption process by fish of these substances dissolved in the water and the board variation of caffeine content in food supplements, we made a pilot study: we performed a concentration-response curve of caffeine using 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L, and 300 mg/L. We selected the highest concentration that did not cause apparent systemic toxicity in fish. We also have the support of literature once concentrations up to 85-100 mg/L of caffeine are considered as high to zebrafish considering their body surface (EGAN et al., 2009).

We distributed the fish randomly in each experiment using the app RANDOM.ORG. Fish were acclimatized for 7 days. After a 15min exposure period, behavioral tasks were assessed by the Novel Tank Test (NTT), Social Preference Test (SPT), Y-maze and it was evaluated oxidative stress markers and the effects on the mitochondrial respiratory chain. We guarantee the stability of MPH in this short exposure time (15 min) considering stability tests previously performed by our research group (MARASCHIN et al., 2017). For a better understanding a scheme of the methodology is represented in Fig. 1.

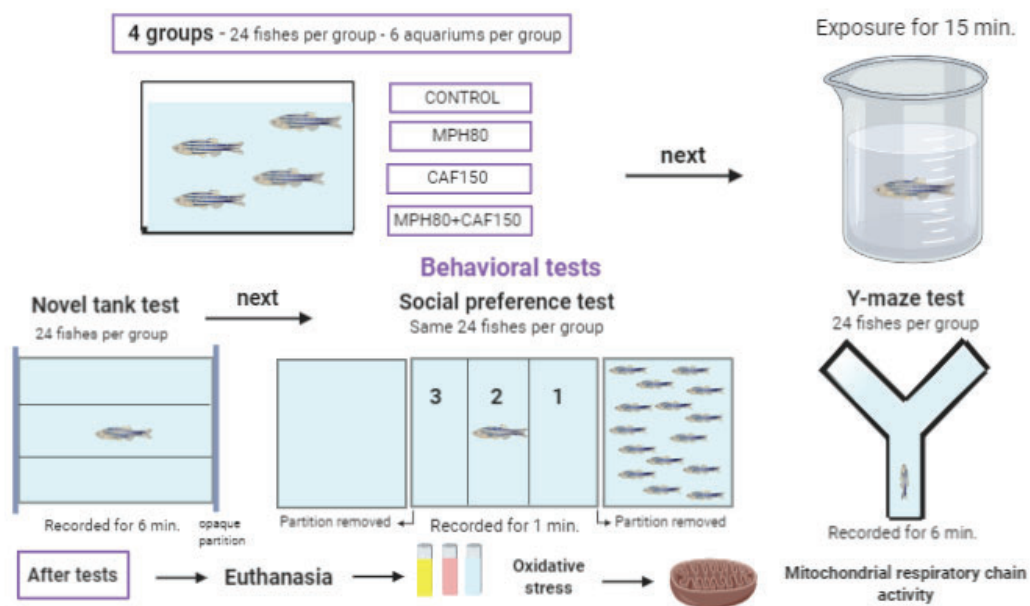


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design.

2.2 Animals and maintenance conditions

A stock population of 96-180-day old adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*), mixed sex, were held in a tank equipped with biological filters, with a natural photoperiod (14 h light:10 h dark) and under constant aeration. Fish were fed twice a day with commercial flaked food provided *ad libitum*. Water temperature was maintained at 26 ± 2 C°, dissolved oxygen concentrations at 6.2 ± 0.4 mg/L, pH 7.0 ± 0.25 , and the total ammonia concentration was less than 0.5 mg/L. Fish used in the study were in perfect health and were not subjected to any procedure or exposure to drugs prior to the experiments.

2.3 Chemicals

All chemicals and reagents were of analytical grade or of the highest grade available. Tablets of Ritalina® 10mg was obtained from Novartis, São Paulo, Brazil. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), Thiobarbituric acid (TBA), Trichloroacetic acid (TCA), Malonyldialdehyde (MDA), 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), L-Cysteina, Rotenone (2R,6aS,12aS)-1,2,6,6a,12,12a-hexahydro-2-isopropenyl-8,9 dimethoxychromeno [3,4-b]furo(2,3-h)chromen-6-one, reduced-b nicotinamide adenine dinucleotide (b-NADH), Potassium ferrocyanide $K_3[Fe(CN)_6]$, Sodium azide and

Cytochrome C reductase were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Heparin, Lauryl maltoside (n-Dodecyl β -D-maltoside) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.4 Evaluation of behavior parameters

The behavioral tests were performed in all groups of zebrafish 15min after the exposure. The tests performed were novel tank test, in which parameters of locomotion and anxiety were evaluated; social preference test, to discriminate fish according to their response to social stimuli; and the Y-maze test to assess cognitive mapping and memory response. The fish performance during the tests were recorded by a Logitech Quickcam PRO 9000 camera located in front of the tank, and the videos analyzed using ANY-maze® software (Stoelting CO, USA). After each test, the water of the tank was completely changed prior to testing a new fish.

2.4.1 Novel Tank Test and Social Preference Test

The NTT and the SPT were performed together, with twelve fish from each group. The novel tank test was carried out first and each fish was placed in the test tank (24×8×20 cm; width×depth×height) that had both lateral sides closed by an opaque partition positioned in between the tanks, as indicated in Fig.1, and its behavior was recorded for 6min. The following parameters were analyzed: distance traveled (m), number of line crossing, absolute turn angle, time spent at the bottom and at the top of the test tank (s) and latency to enter top zone (s). After that, the partitions were carefully removed for the social preference test: one side of the test tank had no fish and the other side had 15 mixed sex conspecifics. The fish behavior was recorded for 60 s to assess its preference for the empty side or conspecifics. For the image analysis, the test tank was virtually divided into three vertical segments, 8 cm width and 6,5 cm height each. The first segment was the one nearest to conspecifics, while the third segment was next to the empty tank. The relative time zebrafish spent in the first segment was calculated as response to social stimuli, as previously described (KIRSTEN et al., 2018).

2.4.2 Spatial memory test (Y-maze task)

The position in the Y-maze task was considered an index of memory (COGNATO et al., 2012). Fish were tested in a tank with three arms measuring 25 × 8 × 15 cm (length × width × height). Different geometric shapes (squares, circles, and triangles) were used as visual stimuli and placed on the outer wall of each arm, and the remaining area was covered with black plastic. The Y-maze arms were randomly assigned: start arm, in which the fish starts the test, new arm (locked during the initial test, but open during the second test), and the permanently open arm. The Y-maze center was considered a neutral area, and therefore, it was not counted in the analysis. The task consisted of two phases with a 1-h interval between them. In the first phase (5 min training), the fish could explore the start and the open arms with the new arm closed. In the second phase, fish were placed in the start arm and were allowed to freely access the three arms. The following parameters were analyzed: time spent into the novel arm (s), entries in the novel arm, latency to enter in the novel arm (s) and total distance travelled (m) as previously described (ZANANDREA et al., 2018).

2.5 Euthanasia

Immediately after performing the behavioral tests, each fish was anesthetized with Eugenol (Sigma Aldrich, Brazil, 50 mg/L) and euthanized by sectioning the spinal cord. Then, each fish was separately packed in microtubes, frozen in liquid nitrogen for 30 seconds and stored at -80 °C.

2.6 Sample treatment

The samples (only the body of the headless fish) were homogenized [1:4 (m/v)] in ice-cold phosphate buffered saline solution, pH 7.5, with an Ultra-Turrax homogenizer and centrifuged (3.000 g, 10 min) (ROSSATO et al., 2013). Aliquots of supernatant were taken to assess protein levels, lipid peroxidation, non-proteic thiols content, nitric acid and protein carbonylation. Mitochondria were isolated from this same aliquot.

2.7 Parameters of oxidative damage

2.7.1 Lipid peroxidation

Lipid Peroxidation was assessed through the thiobarbituric acid reactive species reaction (TBARS) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). The product of this reaction was quantified through spectrophotometry at 535 nm. Results were expressed as $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of protein.

2.7.2 Nitric Oxide

The NO concentration was evaluated colorimetrically using the Griess reagent (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003). The product of this reaction was quantified through spectrophotometry at 540 nm. Results were expressed as $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of protein.

2.7.3 Non-protein Thiols

Non-protein thiols were measured as an indirect measure of intracellular glutathione content (ELLMAN, 1959). The product of this reaction was quantified through spectrophotometry at 412 nm. Results were expressed as $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of protein.

2.7.4 Protein quantification

Protein was determined using the Coomassie blue - Bradford method and bovine serum albumin was used as standard (KRUGUER, 1994). Samples were run in duplicate and the absorbance was measured at 595 nm. Results were expressed as g.L^{-1} .

2.7.5 Protein Carbonylation

Carbonylated protein (CP) levels were measured based on the protocol (YAN; TRABER; PACKER, 1995). Data were measured colorimetrically at 370 nm and calculated using the molar extinction coefficient of 22,000M/cm. Protein carbonylation was expressed as $\text{nmol.mg protein}^{-1}$ (SILVA et al., 2019).

2.8. Activity of mitochondrial respiratory chain enzymes

Tissues were weighed and then homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/ml heparin). The homogenates were centrifuged at 800×g for 10 min, at 4 °C (SILVA et al., 2019).

2.8.1 Complex I activity

NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated determining the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm during 3 min at 25 °C. The results are expressed as nmol. min⁻¹. mg protein⁻¹ (RUSTIN et al., 1994).

2.8.2 Complex II–III activity

The activity of succinate: cytochrome c oxidoreductase (complex III) was determined using the method described by Fischer et al. (1985). 10 µL of homogenates were preincubated during 30 min at 30 °C with reagents. Complex II–III activity was measured by cytochrome c reduction using succinate as substrate at 550 nm during 5 min at 25 °C. The results are expressed as nmol. min⁻¹. mg protein⁻¹ (FISCHER et al., 1985).

2.8.3 Complex IV activity

The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin et al. (1994) and measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c (prepared by reduction of cytochrome with NaBH₄ and HCl) at 550 nm with 580 nm as the reference wavelength during 10 min at 25 °C. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were calculated as nmol. min⁻¹. mg protein⁻¹ (RUSTIN et al., 1994).

2.9 Statistical analysis

Data were compared through two-way ANOVA with CAF and MPH as the independent factors, followed by Tukey's test depending on data normality (as assessed by the Shapiro-Wilk test). Significance was accepted for $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Behavior parameters

3.1.1 Association of MPH and CAF promotes angiogenic behavior

There are significant interaction between MPH and CAF regarding all NTT parameters except the absolute turn angle (see Table 1 for statistics details). Fish exposed to the association MPH+CAF traveled the shortest distance (Fig. 2A), had fewer crossings between the zones (Fig. 2C), presented a lower absolute turn angle (Fig. 2E) and remained less time at the top (Fig. 2B). In addition, there was a longer time spent in the bottom of the aquarium (Fig. 2F). Animals exposed to MPH alone presented the same behavior from control animals.

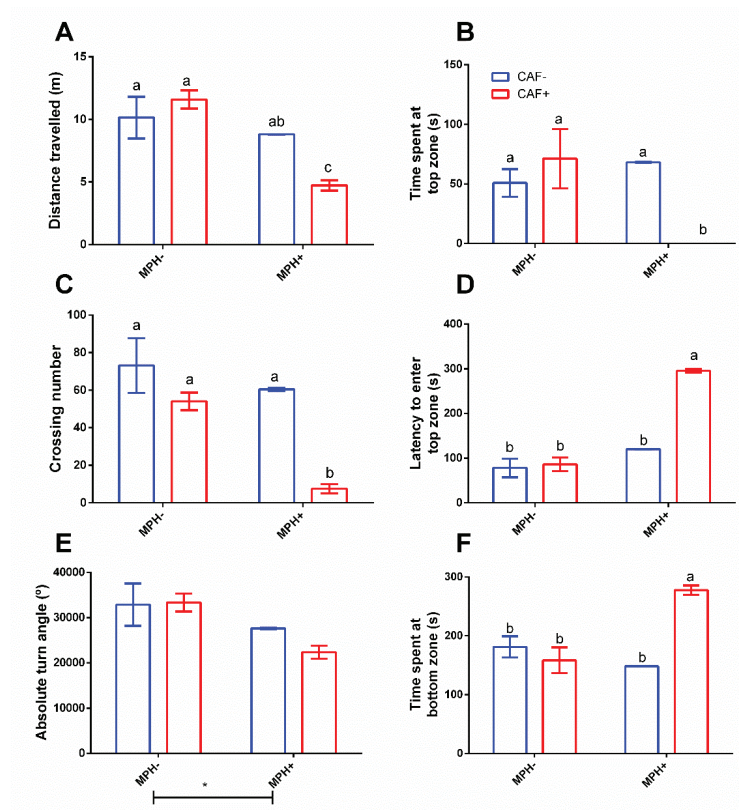


Fig. 2. Behavior parameters tests of fish from the Control, MPH, CAF and MPH+CAF groups in the NTT. Total distance (A), Time spent at top zone (B), number of line crossings (C), Latency to enter top zone (D), Absolute turn angle (E) and Time spent at bottom zone (F). Data are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Different letters mean difference between groups ($p < 0.05$).

3.1.2 MPH induces antisocial behavior

In the SPT, both evaluated parameters presented significant interaction between MPH and CAF (see Table 1 for statistics details). Fish from CAF alone, MPH alone and from MPH+CAF groups remained shorter time in the conspecific segment (Fig. 3A). Fish exposed to MPH alone remains longer time in the empty segment (Fig. 3B), while those exposed to CAF alone or to MPH+CAF presented any significant change when compared to control animals.

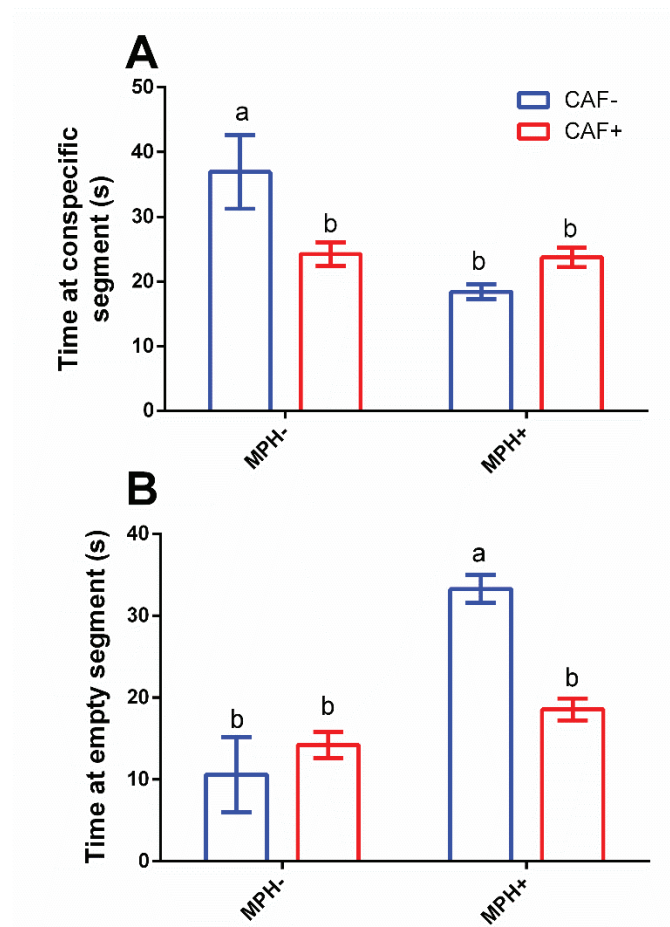


Fig. 3. Social behavior parameters of zebrafish from the Control, MPH 80, CAF 150 and MPH80+CAF150 groups in the SPT. Time at conspecific segment (A) and Time at empty segment (B). Data are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Different letters mean difference between groups ($p < 0.05$).

3.1.3 MPH+CAF causes changes in memory

In the Y-maze Task, there is a significant MPH effect (see Table 1) on the time spent in the new arm (Fig. 4A), with both isolated and CAF-associated MPH groups remaining less time in the new arm (Fig. 4A). There was no difference between all groups in entries in the new arm (Fig. 4B), latency for entry in the new arm (Fig. 4C). In addition, there was no effect on the total distance traveled in the apparatus, evidencing the absence of locomotor effect. Thus, fish kept moving but avoided the new arm when it was opened (Fig. 4D).

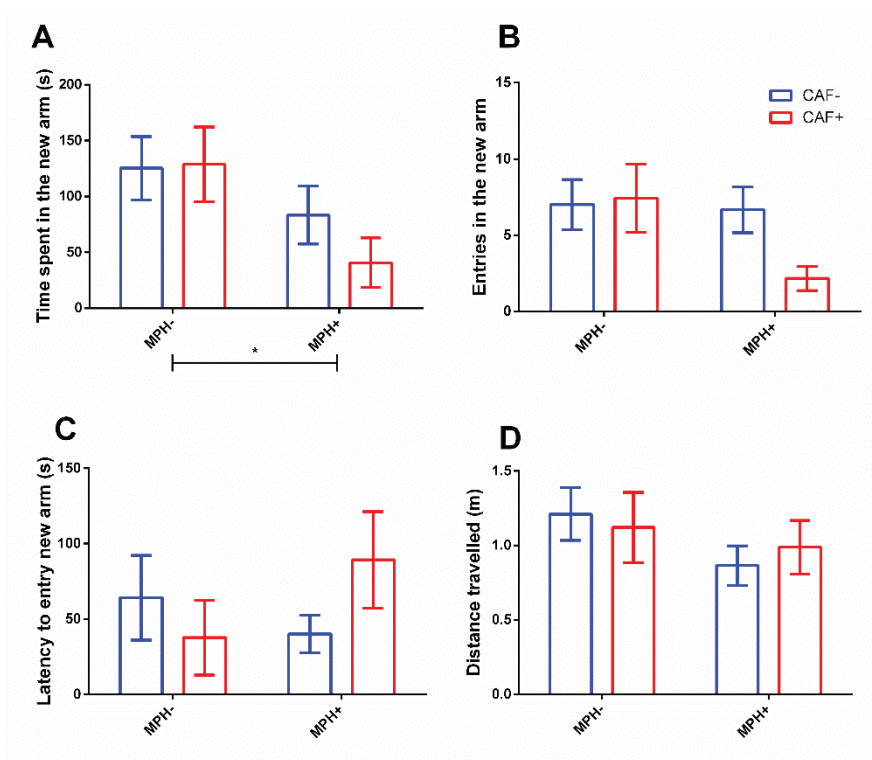


Fig. 4. Effects of MPH and CAF on relative time spent in the novel arm in the Y-maze test in zebrafish. Time spent in the new arm (A), Entries in the new arm (B), Latency to entry new arm (C) and Total distance (D). Data are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Different letters mean difference between groups ($p < 0.05$).

3.2 Acute exposure to MPH and CAF alters oxidative stress parameters in fish

There is a significant interaction between CAF and MPH regarding TBARS levels (Table 1 for details). In fact, CAF alone induced an increased lipoperoxidation, which was reversed when in association with MPH (Fig. 5A). Regarding protein carbonylation, also there is a significant interaction between CAF and MPH with the association group increasing it (Fig. 5B). In addition, CAF caused a greater release of nitric oxide compared

to control, evidenced by the CAF effect on the two-way ANOVA (Fig. 5C). No changes were observed on the non-protein thiols (Fig. 4D). There is a significant CAF effect decreasing the total protein levels (Fig. 5E).

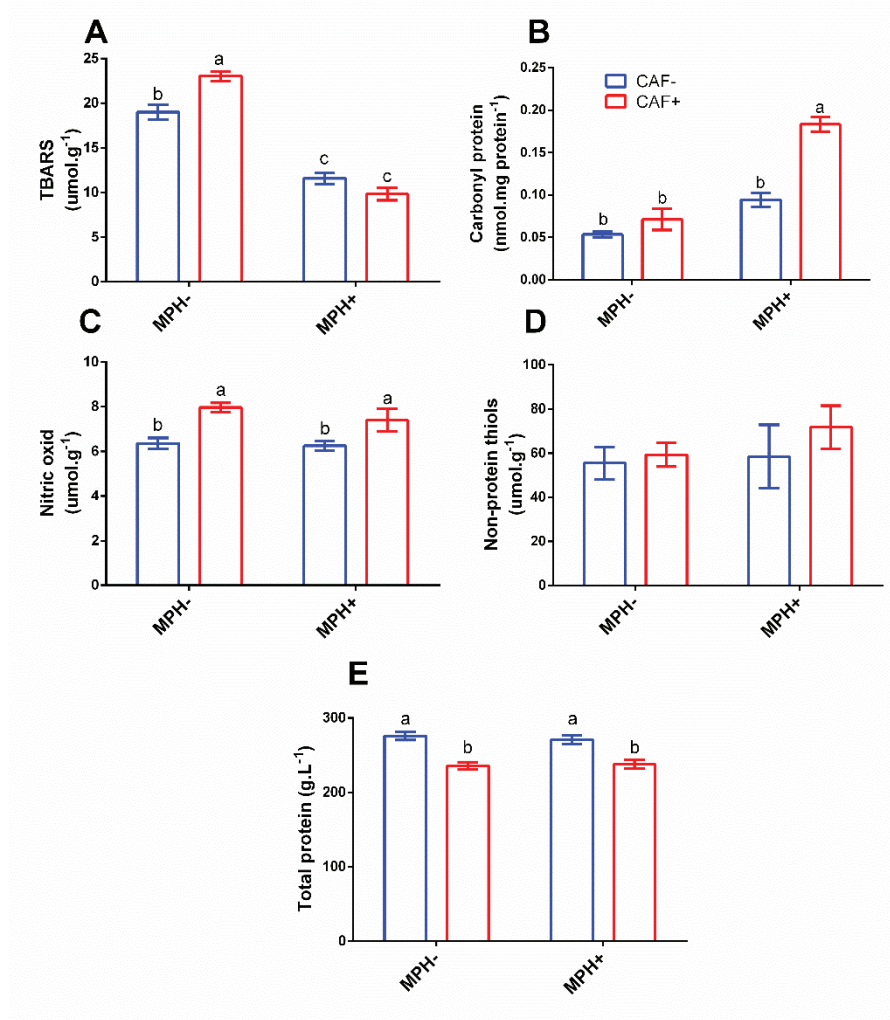


Fig. 5. Oxidative stress parameters tests of fish from the Control, MPH 80, CAF 150 and MPH80+CAF150 groups TBARS (A), Carbonyl protein (B), Nitric oxide (C), Non-protein thiols (D) and Total protein (E). Data are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Different letters mean difference between groups ($p < 0.05$).

3.3 CAF increases mitochondrial metabolism

There is a significant interaction between CAF and MPH regarding the complexes II-III and IV (see Table 1 for details). In fact, CAF increased the activity of mitochondrial complexes II-III and IV (Figs. 6B and 6C). There were no significant differences in activity with mitochondrial complex I (Fig. 6A).

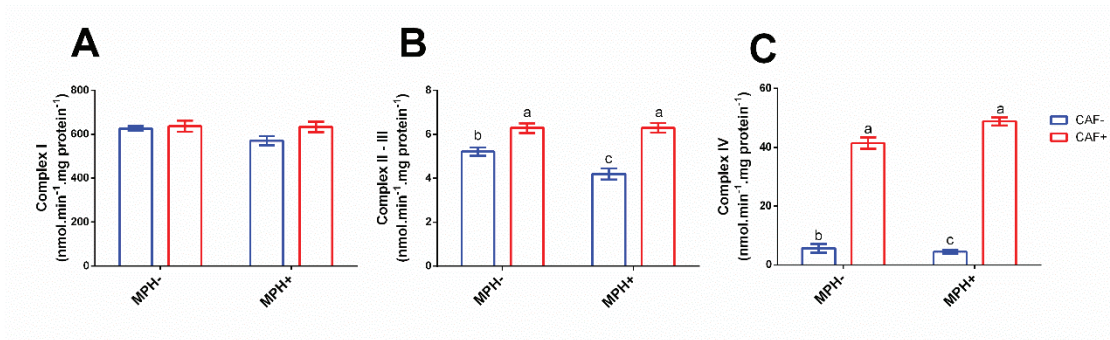


Fig. 6. Mitochondrial parameters tests of fish from the Control, MPH 80, CAF 150 and MPH80+CAF150 groups. Complex I (A), Complex II-III (B) and Complex IV (C). Data are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and analyzed by a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. Different letters mean difference between groups ($p < 0.05$).

Table 1. Statistical details of the comparisons made. Significant effects in bold.

Test/evaluation (Figure)	Parameter		P value	F value	DF
Novel Tank Test (Figure 2)	Distance travelled	Interaction	0.0050	8.753	1, 44
		MPH effect	< 0.0001	19.34	1, 44
		CAF effect	0.1626	2.017	1, 44
	Time spent at top	Interaction	0.0023	10.43	1, 44
		MPH effect	0.0561	3.849	1, 44
		CAF effect	0.0876	3.052	1, 44
	Crossing number	Interaction	0.0347	4.748	1, 44
		MPH effect	0.0004	14.52	1, 44
		CAF effect	< 0.0001	21.50	1, 44
	Latency to enter top zone	Interaction	< 0.0001	44.28	1, 43
		MPH effect	< 0.0001	99.58	1, 43
		CAF effect	< 0.0001	52.78	1, 43
Absolute turn angle	Interaction	0.2847	1.173	1, 44	
	MPH effect	0.0036	9.447	1, 44	
	CAF effect	0.3692	0.8230	1, 44	
Time spent at bottom	Interaction	< 0.0001	26.98	1, 44	
	MPH effect	0.0052	8.650	1, 44	
	CAF effect	0.0007	13.29	1, 44	
Social Preference Test (Figure 3)	Time spent at conspecific segment	Interaction	0.0061	8.315	1, 44
		MPH effect	0.0040	9.229	1, 44
		CAF effect	0.2445	1.391	1, 44
	Time spent at empty segment	Interaction	0.0013	11.76	1, 44
		CAF effect	0.0437	4.311	1, 44
Y-maze Task (Figure 4)	Time spent in the new arm	Interaction	0.4125	0.6844	1, 44
		MPH effect	0.0236	5.497	1, 44
		CAF effect	0.4838	0.4988	1, 44
	Entries in the new arm	Interaction	0.1390	2.271	1, 44
		CAF effect	0.2174	1.566	1, 44

	Latency to enter new arm	Interaction	0.1439	2.214	1, 44
		MPH effect	0.5889	0.2964	1, 44
		CAF effect	0.6567	0.2003	1, 44
	Distance travelled	Interaction	0.5695	0.3284	1, 44
		MPH effect	0.2017	1.680	1, 44
		CAF effect	0.9298	0.007856	1, 44
Oxidative stress (Figure 5)	Carbonyl protein	Interaction	0.0002	16.50	1, 40
		MPH effect	0.0001	75.29	1, 40
		CAF effect	< 0.0001	36.79	1, 40
	TBARS	Interaction	< 0.0001	18.48	1, 92
		MPH effect	< 0.0001	234.6	1, 92
		CAF effect	0.0949	2.848	1, 92
	Nitric Oxid	Interaction	0.4656	0.5368	1, 92
		MPH effect	0.2779	1.191	1, 92
		CAF effect	< 0.0001	18.91	1, 92
	Non-protein thiols	Interaction	0.6256	0.2396	1, 92
		MPH effect	0.4317	0.6236	1, 92
		CAF effect	0.3879	0.7527	1, 92
	Total protein	Interaction	0.5091	0.4393	1, 92
		MPH effect	0.7743	0.0827	1, 92
		CAF effect	<0.0001	44.04	1, 92
Mitochondrial metabolism (Figure 6)	Complex I	Interaction	0.2174	1.542	1, 92
		MPH effect	0.1607	2.000	1, 92
		CAF effect	0.0837	3.057	1, 92
	Complex II and III	Interaction	0.0244	5.235	1, 92
		MPH effect	0.0260	5.120	1, 92
		CAF effect	< 0.0001	49.93	1, 92
	Complex IV	Interaction	0.0037	8.855	1, 92
		MPH effect	0.0307	4.814	1, 92
		CAF effect	< 0.0001	774.3	1, 92

A summary of behavioral changes, oxidative status and mitochondrial respiratory chain observed in fish in response to acute exposure are depicted in Table 1.

4. Discussion

Here we evidenced that the association of MPH+CAF, stimulants frequently used in high doses aiming to enhance performance, in fact impairs memory. Zebrafish exposed to MPH+CAF kept moving, but avoided the new arm when it was opened and remained in known arms of the apparatus. Theoretically, these results shows that fish did not remember they had already explored them, confirming that the natural tendency to explore the new arm was inhibited by the combination of drugs, which is interpreted as a memory deficit (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014). MPH effects on memory

are controversial. Memory impairment is described at high doses (SALMAN et al., 2019), however, here the deleterious effects on memory were also observed in association with CAF. It is known that low doses (0,3 – 10 mg/Kg) of CAF improves memory and high doses (30 mg/Kg) cause deleterious effect in rats (ANGELUCCI, 2002). Zebrafish chronically treated with a moderate acute dose (50 mg/L) of CAF performs well in cognitive tasks. However, the authors suggest that the continued use of high doses (100 mg/L) of CAF causes cognitive impairment, that is, the animal does not discriminate against a new object, assessed through an object discrimination test (SANTOS et al., 2016). Here, high dose of CAF alone were not enough to cause memory deficit, but the association of both stimulants harmed memory.

We also show that MPH causes an antisocial effect. The zebrafish lives in shoals and this strategy is effective against attack by predators, contributing to maintenance of their survival (SAVERINO; GERLAI, 2008; SPENCE et al., 2008; WEIS et al., 2001). Changes observed in the social behavior can impair the reproduction compromising the survival and perpetuation of the species (CALISTO; DOMINGUES; ESTEVES, 2011; CALISTO; ESTEVES, 2009). In humans, MPH can negatively impact interpersonal relationships when exposure to the drug is prolonged (LOUREIRO-VIEIRA et al., 2017) and without proper medical prescription, especially when used in adolescence, which involves critical stages of neurodevelopment (CAIRNS et al., 2016). In our study, CAF association attenuated MPH-induced social impairment, but in this group, the social deficit is still present if compared to unexposed controls.

The association of MPH + CAF caused an increase in anxiety of the fish, showing an anxiogenic behavior, since diving response shows fish seems to be scared, the same as described when they were exposed to other stimulant drugs such as cocaine (PAROLINI et al., 2017), and the degree of ‘bottom dwelling’ can therefore be used as a measure of risk-taking behavior (THÖRNQVIST et al., 2018). MPH is a psychotropic drug that inhibits the reuptake of adrenaline and norepinephrine (BABCOCK; BYRNE, 2000; WENTHUR, 2016). CAF stimulates neural activity through increased noradrenaline emission (CAVIOLA; FABER, 2015), and it has a biphasic effect: small doses decreases anxiety and increases locomotion while high doses are anxiogenic (ALAMIN et al., 2016; ANGELUCCI, 2002; ELEGANTE et al., 2010). The biological effects of CAF are related to three main modulatory points (BARCELOS et al., 2020): non-selective antagonistic effects on adenosine A1 and A2 receptors (PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012), phosphodiesterase inhibition and calcium mobilization

(CHAN et al., 2006; SARDÃO; OLIVEIRA; MORENO, 2002). The neuromodulatory and behavioral role of adenosine stands out mainly in A1 receptors, in which there is modulation of responses related to anxiety (LONGHI et al., 2014).

Table 1 summarizes and brings statistical details of all the changes found to visualize the mechanisms involved behind the behavior. Mechanistically, the observed changes in MPH+CAF-exposed fish might be related to mitochondrial energy metabolism and oxidative stress. In fact, CAF increases the mitochondrial energy metabolism evidenced by the increased activity of complexes II-III and IV. Decoupling of the mitochondrial proton gradient caused by CAF is already widely described (ALAMIN et al., 2016; GONÇALVES et al., 2018) and consists of the dissipation of the proton gradient formed in the intermembrane space, by generating a permeability in the mitochondrial membrane internal to the hydrogen ions. Thus, the decoupling between electron transport and the synthesis of Adenosine Triphosphate (ATP) occurs (SOUZA et al., 2013).

The mitochondrial respiratory chain is the main intracellular source of reactive species (ROSSATO et al., 2014), causing oxidative stress (SOUSTIEL; LARISCH, 2010). In our study, the only oxidative damage found by MPH+CAF was the increase in protein carbonylation, an irreversible oxidative damage marker associated to a permanent loss of function (DONNE-DALLE et al., 2006). If the carbonylated proteins are not degraded, their accumulation leads to cell and tissue injury (DONNE-DALLE et al., 2006). Studies show that MPH induces protein carbonyl formation in specific brain areas (COMIN et al., 2014; MARTINS et al., 2006) such as cerebellum, hippocampus, and striatum of young and adult male Wistar rats chronically exposed to MPH (MARTINS et al., 2006). Oxidative damage was not seen in lipid peroxidation markers or non-protein thiols content evaluated here. In fact, results suggest an antioxidant pattern in fish exposed to MPH or MPH+CAF in TBARS assay. Antioxidant effects was already related to MPH in antioxidant enzymes, reactive species generation and lipid peroxidation markers (ZHU et al., 2018).

CAF group presented greater release of Nitric Oxide (NO). NO is an important neurotransmitter which acts on memory and learning (VANAJA; PERUMAL, 2011). Here we demonstrate how high doses of MPH and CAF impact the neurological profile, causing cognitive dysfunction. These changes are evidenced by memory impairment, anxiogenic and antisocial behavior. Our results highlight the potential risk and consequences of MPH abusive use which can lead to irreversible damage.

5. Ethical Note

This study was approved by the Ethics Commission for Animal Use (CEUA) at Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil (Protocol 026/2019) and met the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). In addition, this research was registered in SisGen (Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) and complied with their guidelines (registration code A14E252).

6. Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

7. Acknowledgements

This study was supported by FAPERGS, by means of the edicts 05/2017 (Project n° 88887.161013 / 2017-00) and ARD / 2017 (grant term number 17 / 2551 – 0000 804-9). The authors thankful a Pharmacy São João for the donation of the Ritalin®. L.J.G.B. is supported by grants of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) 18/2551-0000-493-6 and 19/2551-0001-873-8 and by a research fellowship of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 303263/2018-0.

References

- ABDELKADER, T. S. et al. Exposure time to caffeine affects heartbeat and cell damage-related gene expression of zebrafish *Danio rerio* embryos at early developmental stages. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 11, p. 1277–1283, 2013.
- ALAMIN, M. et al. Caffeine Induces the Stress Response and Up-Regulates Heat Shock Proteins in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 2, p. 163–168, 2016.
- ANGELUCCI, M. E. M. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1201–1208, 2002.
- BABCOCK, Q.; BYRNE, T. Student perceptions of methylphenidate abuse at a public liberal arts college. **Journal of the American College Health Association**, v. 49, n. 3, p. 143–145, 2000.
- BALDISSERA, M. D. et al. A caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and prevents oxidative damage in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to hypoxia. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 1041–1049, 2019.
- BARCELOS, R. P. et al. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and on exercise performance. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1–49, 2020.
- BLOOMER, R. J. et al. Safety profile of caffeine and 1,3-dimethylamylamine supplementation in healthy men. **Human and Experimental Toxicology**, v. 32, n. 11, p. 1126–1136, 2013.
- BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. São Paulo: Manole, 2003.
- BRASIL; ANVISA. Justificativas para os limites mínimos e máximos de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas da proposta regulatória de suplementos alimentares. Gerência-Geral de Alimentos Sumário. p. 1–36, 2018.
- CAIRNS, R. et al. ADHD medication overdose and misuse: the NSW Poisons Information Centre experience, 2004-2014. **The Medical Journal of Australia**, v. 204, n. 4, p. 1–7, 2016.
- CALISTO, V.; DOMINGUES, M. R. M.; ESTEVES, V. I. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments--kinetics and photodegradation products. **Water Res**, v. 45, p. 6097–106, nov. 2011.
- CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Chemosphere psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, p. 1257–74, nov. 2009.
- CAVIOLA, L.; FABER, N. S. Pills or Push-Ups ? Effectiveness and Public Perception of Pharmacological and Non-Pharmacological Cognitive Enhancement. **Frontiers in Psychology**, v. 6, n. 1852, p. 1–8, 2015.
- CHALLMAN, T. D.; LIPSKY, J. J. Methylphenidate: its pharmacology and uses. **Mayo**

Clinic proceedings, v. 75, p. 711–721, 2000.

CHAN, E. S. L. et al. Adenosine A_{2A} receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. **British Journal Of Pharmacology**, v. 148, p. 1144–1155, 2006.

COGNATO, G. DE P. et al. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 98, n. 4, p. 321–328, 2012.

COMIN, C. M. et al. Methylphenidate treatment causes oxidative stress and alters energetic metabolism in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 26, n. 2, p. 96–103, 2014.

DE CARVALHO, T. S. et al. Oxidative Stress Mediates Anxiety-Like Behavior Induced by High Caffeine Intake in Zebrafish: Protective Effect of Alpha-Tocopherol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–10, 2019.

DONNE-DALLE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389–406, 2006.

EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to caffeine and increased fat oxidation leading to a reduction in body fat mass (ID 735 , 1484), increased energy expenditure leading to a reduction in body weight and increased attention. v. 9, n. 1924, p. 1–29, 2011.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research journal**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2009.

ELEGANTE, M. F. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2010.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

FAGUNDES, A. et al. Effect of acute and chronic administration of methylphenidate on mitochondrial respiratory chain in the brain of young rats. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 11, p. 1675–80, nov. 2010.

FARAONE, S. V. et al. Systematic Review: Nonmedical Use of Prescription Stimulants: Risk Factors, Outcomes, and Risk Reduction Strategies. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 100–112, 2020.

FDFW. Uso abusivo de ritalina. **Foundation for a Drug Free World**, p. 1–23, 2016.

FISCHER, J. C. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v. 153, n. 1, p. 23–36, 1985.

GONÇALVES, D. F. et al. Caffeine and acetaminophen association: Effects on mitochondrial bioenergetics. **Life Sciences**, v. 193, p. 234–241, 2018.

GURLEY, B. J.; STEELMAN, S. C.; THOMAS, S. L. Multi-ingredient, Caffeine-Containing Dietary Supplements: History, Safety, and Efficacy. **Clinical Therapeutics**, p. 1–27, 2014.

- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498–503, 2013.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014.
- KIRSTEN, K. et al. Characterization of sickness behavior in zebrafish. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 73, p. 596–602, 2018.
- KRUGUER, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. **The Protein Protocols Handbook**, v. 32, p. 09–15, 1994.
- LEONARD, B. E. et al. Methylphenidate : a review of its neuropharmacological , neuropsychological and adverse clinical effects. **Human Psychopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 151–180, 2004.
- LONGHI, M. S. et al. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 2, p. 165–172, 2014.
- LOUREIRO-VIEIRA, A. S. et al. Methylphenidate effects in the young brain: Friend or foe? **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 60, p. 1–42, 2017.
- MAIER, L. J. et al. To Dope or Not to Dope : Neuroenhancement with Prescription Drugs and Drugs of Abuse among Swiss University Students. **Plos one**, v. 8, n. 11, 2013.
- MARASCHIN, B. et al. “ Environmental ritalinization ” : Brain structural changes after exposition to methylphenidate residues. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 25, p. 289–294, 2017.
- MARTINS, M. et al. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. **Brain Research**, v. 1078, n. 1, p. 189–97, mar. 2006.
- MAXIMINO, C.; HERCULANO, A. M. A Review of Monoaminergic Neuropsychopharmacology in Zebrafish. **Zebrafish**, v. 7, n. 4, p. 359–378, 2010.
- MOTAGHINEJAD, M.; MOTEVALIAN, M.; SHABAD, B. Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. **Neuroscience Letters**, p. 106–113, 2015.
- NEVES, D. B. DA J.; CALDAS, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 194–202, 2017.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.
- PANULA, P. et al. Neurobiology of Disease The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebra fi sh CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, 2010.
- PAROLINI, M. et al. Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cyto-genotoxic effects in zebrafish embryo cells. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 504–514, 2017.

PICCIOTTO, M.; HIGLEY, M.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116–129, 2012.

RAH, Y. C. et al. In vivo assessment of hair cell damage and developmental toxicity caused by gestational caffeine exposure using zebrafish (*Danio rerio*) models. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 64, p. 1–7, 2017.

ROSSATO, L. G. et al. Therapeutic concentrations of mitoxantrone elicit energetic imbalance in H9c2 cells as an earlier effect. **Cardiovascular Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 413–425, dez. 2013.

ROSSATO, L. G. et al. Mitochondrial cumulative damage induced by mitoxantrone: late onset cardiac energetic impairment. **Cardiovasc Toxicol**, v. 14, n. 1, p. 30–40, mar. 2014.

RUSTIN, P. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, v. 228, n. 1, p. 35–51, 1994.

SAIKI, S. et al. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. **Autophagy**, v. 7, n. 2, p. 176–187, 2011.

SALMAN, T. et al. Enhancement and impairment of cognitive behaviour in Morris water maze test by methylphenidate to rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 32, n. 3, p. 899–903, 2019.

SANTOS, L. C. et al. Irish coffee: Effects of alcohol and caffeine on object discrimination in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 143, p. 34–43, 2016.

SANTOS, M. K. et al. DART-MS/MS screening for the determination of 1,3-dimethylamylamine and undeclared stimulants in seized dietary supplements from Brazil. **Forensic Chemistry**, v. 8, p. 134–145, 2018.

SARDÃO, V. A.; OLIVEIRA, P. J.; MORENO, A. J. Caffeine Enhances the Calcium-Dependent Cardiac Mitochondrial Permeability Transition : Relevance for Caffeine Toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 179, p. 50–56, 2002.

SAVERINO, C.; GERLAI, R. The social zebrafish : Behavioral responses to conspecific , heterospecific , and computer animated fish. **Behavioural Brain Research journal**, v. 191, n. 1, p. 77–87, 2008.

SILVA, C. S. et al. Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behavior in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 282, p. 77–84, 2018.

SILVA, M. C. et al. Omega-3 fatty acid supplementation can prevent changes in mitochondrial energy metabolism and oxidative stress caused by chronic administration of L-tyrosine in the brain of rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 4, p. 1207–1219, 2019.

SOUSTIEL, J. F.; LARISCH, S. Mitochondrial damage: a target for new therapeutic horizons. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 1, p. 13–21, jan. 2010.

SOUZA, M. et al. Neurochemistry International Antioxidant activity elicited by low dose of caffeine attenuates pentylentetrazol-induced seizures and oxidative damage in

- rats. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 6, p. 821–830, 2013.
- SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2008.
- THÖRNQVIST, P.-O. et al. Bold zebrafish (*Danio rerio*) express higher levels of delta opioid and dopamine D2 receptors in the brain compared to shy fish. **Behavioural Brain Research**, v. 359, n. 1, p. 927–934, 2018.
- TUNNICLIFFE, J. M. et al. Consumption of dietary caffeine and coffee in physically active populations: physiological interactions. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 33, n. 6, p. 1301–1310, 2008.
- VANAJA, P.; PERUMAL, E. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 5, p. 471–478, 2011.
- VENHUIS, B. et al. A cocktail of synthetic stimulants found in a dietary supplement associated with serious adverse events. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 6, p. 1–4, 2014.
- WADA. The World Anti-Doping Code Non-Approved Substances Anabolic Agents. n. J, p. 10, 2018.
- WEIS, J. S. et al. Effects of Contaminants on Behavior : Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. **BioScience**, v. 51, n. 3, p. 209–217, 2001.
- WENTHUR, C. J. Classics in Chemical Neuroscience: Methylphenidate. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 1030–1040, 2016.
- YAN, L. J.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric Method for Determination of Carbonyls in Oxidatively Modified Apolipoprotein B of Human Low-Density Lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 228, p. 349–351, 1995.
- ZANANDREA, R. et al. Lithium prevents scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 664, p. 34–37, 2018.
- ZHU, M. et al. Methylphenidate ameliorates hypoxia-induced mitochondrial damage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through inhibition of oxidative stress. **Life Sciences**, v. 197, n. 1, p. 40–45, 2018.

4 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

1. O MTF utilizado em um contexto abusivo provoca comportamento antissocial.
2. A associação de MTF e CAF aumenta a ansiedade.
3. A CAF aumenta o metabolismo energético mitocondrial evidenciado pela atividade dos complexos II-III e IV e aumenta a liberação de óxido nítrico, o qual está fortemente relacionado à aprendizagem e a memória.
4. O MTF promove aumento das proteínas carboniladas, promovendo dano oxidativo.
5. As alterações observadas pelo MTF + CAF podem estar relacionadas ao metabolismo energético mitocondrial e ao estresse oxidativo.
6. A associação de MTF e CAF em altas doses, com o objetivo de melhorar o desempenho, de fato, prejudica a memória.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aqui demonstramos que o MTF utilizado de forma não terapêutica, a fim de melhorar cognitiva em pessoas sem o TDAH é controverso, principalmente quando associado a outros estimulantes como a CAF, e pode de fato prejudicar a memória e promover o abuso de drogas subsequente.

Embora o Sistema Nacional de Produtos Controlados (SNGPC) represente um progresso na comercialização de medicamentos controlados, as evidências da aquisição do MTF sem prescrição é um indicativo de falhas nas políticas públicas direcionadas a esse controle. Essas falhas expõem a população a graves riscos à saúde e a riscos legais, uma vez que a aquisição e a comercialização de produtos controlados sem prescrição e fora de estabelecimentos autorizados são tipificadas como delitos penais. Assim, apesar do crescente uso do MTF como “realçador cognitivo”, vale ressaltar que esta droga não foi desenvolvida para este fim. Essa situação ressalta a importância de recorrer a abordagens inovadoras baseadas em evidências a fim de reduzir os danos e o UNM do MTF. Em suma, faz-se necessário um controle rigoroso na dispensação do MTF, o que inclui a implementação de protocolos rígidos, os quais podem atuar como barreiras, e uso racional deste medicamento, o qual deve ser prescrito apenas para indivíduos com diagnóstico de TDAH.

6 REFERÊNCIAS

1. Cheng J, Xiong Z, Duffney LJ, Wei J, Liu A, Liu S, et al. Methylphenidate exerts dose-dependent effects on glutamate receptors and behaviors. *Biol Psychiatry*. 2014;76(12):953–62.
2. Brant LC, Carvalho TRF. Medicamento gadget da contemporaneidade. *Interface: comunicação, saúde e educação*. 2012;623–36.
3. WADA. 2015 Anti-Doping Testing Figures Anti-Doping Testing Figures by Laboratory. 2015;22:117–239.
4. WADA. The World Anti-Doping Code Non-Approved Substances Anabolic Agents. 2018;(J):10. Available from: http://www.abcd.gov.br/arquivos/prohibited_list_2018_en.pdf
5. Maier LJ, Lietchi ME, Herzig F, Schaub MP. To Dope or Not to Dope : Neuroenhancement with Prescription Drugs and Drugs of Abuse among Swiss University Students. *Plos one*. 2013;8(11).
6. Santos MK, Gleco E, Davidson T, Jackson G, Limberger RP, Arroyo L. DART-MS/MS screening for the determination of 1,3-dimethylamylamine and undeclared stimulants in seized dietary supplements from Brazil. *Forensic Chem*. 2018;8:134–45.
7. Hu B, Huang Y, Zhang G, Zhang L, Wang T, Yao Z-P. Rapid detection of adulterated drugs in herbal dietary supplements by wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Methods*. 2016;(38):6840–6.
8. Hachem R, Assemat G, Martins N, Balayssac S, Gilard V, Martino R, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Proton NMR for detection , identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss. *J Pharm Biomed Anal [Internet]*. 2016;124(1):34–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.022>
9. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease : zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2010;8:353–67.
10. Challman TD, Lipsky JJ. Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin Proc*. 2000;75:711–21.
11. Leonard BE, McCartan D, White J, King DJ. Methylphenidate : a review of its neuropharmacological , neuropsychological and adverse clinical effects. *Hum Psychopharmacol*. 2004;19(3):151–80.
12. Babcock Q, Byrne T. Student perceptions of methylphenidate abuse at a public liberal arts college. *J Am Coll Health Assoc*. 2000;49(3):143–5.
13. Wenthur CJ. Classics in Chemical Neuroscience: Methylphenidate. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7(8):1030–40.
14. Rakik-Goldman PS. The Cortical Dopamine System: Role in Memory and Cognition. *Adv Pharmacol*. 1998;42(1):707–11.
15. Takahashi H, Kato M, Takano H, Arakawa R, Okumura M, Otsuka T, et al. Differential Contributions of Prefrontal and Hippocampal Dopamine D 1 and D 2 Receptors in Human Cognitive Functions. *J Neurosci*. 2008;28(46):12032–8.
16. Tomasi D, Volkow ND, Wang GJ, Wang R, Telang F, Caparelli EC, et al. NeuroImage Methylphenidate enhances brain activation and deactivation responses to visual attention and working memory tasks in healthy controls. *Neuroimage [Internet]*. 2011;54(4):3101–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.10.060>
17. DRUGS. Disponível em: < <http://www.drugs.com/methylphenidate.html>>.

- Acesso em 22 de abril de 2019. 2016;
18. Kimko HC, Cross JT, Abernethy DR. Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. *Clin Pharmacokinet.* 1999;37(6):457–70.
 19. Wolraich ML, Doffing MA. Pharmacokinetic Considerations in the Treatment of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder with Methylphenidate. *CNS Drugs.* 2004;18(4):243–50.
 20. Mehta MA, Goodyer IM, Sahakian BJ. Methylphenidate improves working memory and set-shifting in AD / HD : relationships to baseline memory capacity. *J Child Psychol Psychiatry.* 2004;45(2):293–305.
 21. Morton WA, Stockton GG. Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2000;2(5):159–64.
 22. Tunnicliffe JM, Eedman KA, Reimer RA, Lun V, Shearer J. Consumption of dietary caffeine and coffee in physically active populations: physiological interactions. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008;33(6):1301–10.
 23. Salinero JJ, Lara B, Coso J Del. Effects of acute ingestion of caffeine on team sports performance : a systematic review and meta-analysis. *Res Sport Med.* 2019;27(2):238–56.
 24. Tallis J, James RS, Cox VM, Duncan MJ. The effect of physiological concentrations of caffeine on the power output of maximally and submaximally stimulated mouse EDL (fast) and soleus (slow) muscle. *J Appl Physiol.* 2018;112(1):64–71.
 25. Ferré S. Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine : implications for substance use disorders. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(10):1963–79.
 26. McLellan TM, Bell DG. The Impact of Prior Coffee Consumption on the Subsequent Ergogenic Effect of Anhydrous Caffeine. *J Sport Nutr Exerc Metab.* 2004;14(6):698–708.
 27. Moura TA, Oliveira L, Rocha MS. International Journal of Biological Macromolecules Effects of caffeine on the structure and conformation of DNA : A force spectroscopy study. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2019;130(1):1018–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.125>
 28. Barcelos RP, Lima FD, Carvalho NR, Bresciani G, Royes LFF. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and on exercise performance. *Nutr Res.* 2020;20:1–49.
 29. Picciotto M, Higley M, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron.* 2012;76(1):116–29.
 30. Chan ESL, Montesinos MC, Fernandez P, Desai A, Delano DL, Yee H, et al. Adenosine A 2A receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *Br J Pharmacol.* 2006;148:1144–55.
 31. Sardão VA, Oliveira PJ, Moreno AJ. Caffeine Enhances the Calcium-Dependent Cardiac Mitochondrial Permeability Transition : Relevance for Caffeine Toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;179:50–6.
 32. Wood S, Sage JR, Shuman T, Anagnostaras SG. Psychostimulants and Cognition : A Continuum of Behavioral and Cognitive Activation. *Pharmacological Rev.* 2014;66(1):193–221.
 33. Haam J, Yakel JL, Institutes N, Services H. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem.* 2018;142(2):111–21.
 34. EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to caffeine and increased fat oxidation leading to a reduction in body fat mass (ID 735 , 1484), increased energy expenditure leading to a reduction in body weight

- and increased attention. 2011;9(1924):1–29.
35. Alamin M, Kawasaki I, Gong J, Shim Y. Caffeine Induces the Stress Response and Up-Regulates Heat Shock Proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*. 2016;39(2):163–8.
 36. Angelucci MEM. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Brazilian J Med Biol Res*. 2002;35(10):1201–8.
 37. Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien H, Mohnot S, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2010;205(1):38–44.
 38. Smith A. Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(1):1243–55.
 39. Caviola L, Faber NS. Pills or Push-Ups ? Effectiveness and Public Perception of Pharmacological and Non-Pharmacological Cognitive Enhancement. *Front Psychol*. 2015;6(1852):1–8.
 40. Chu YF, Chang WH, Black RM, Liu JR, Sompol P, Chen Y, et al. Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid β 1-42 levels in an Alzheimer's mouse model. *Food Chem* [Internet]. 2012;135(3):2095–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.148>
 41. Gołombiowska K, Wardas J, Noworyta-Sokołowska K, Kamińska K, Górska A. Effects of adenosine receptor antagonists on the in vivo lps-induced inflammation model of parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2013;24(1):29–40.
 42. Cabrera-Gomez M carmen, Domenech E, Vinã J. Moderate exercise is an antioxidant : Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):126–31.
 43. Leon-Carmona JR, Galano A. Is Caffeine a Good Scavenger of Oxygenated Free Radicals ? *J Phys Chem*. 2011;115(15):4538–46.
 44. Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem*. 2001;79(3):463–84.
 45. Longhi MS, Hill D, Robson SC, Bernstein SH. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J Mol Med*. 2014;91(2):165–72.
 46. Scripts E, 2020. TA to AD em: <<https://www.express-scripts.com/corporate/drug-trend-report/turning-attention-adhd>>. A em 27 de junho de. *Turning Attention to ADHD*. 2014.
 47. BRASIL, ANVISA. Prescrição e consumo de metilfenidato no Brasil: identificando riscos para o monitoramento e controle sanitário. *Bol Farm*. 2012;2(2):1–14.
 48. BRASIL, ANVISA. Regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Portaria 344 12 maio 1998. 1998;1:1–84.
 49. Pham T, Milanaik R, Kaplan A, Papaioannou H, Adesman A. Household Diversion of Prescription Stimulants : Medication Misuse by Parents of Children with Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2017;xx(xx):1–6.
 50. US, FDA. Abuse-Deterrent Opioids — Evaluation and Labeling. Guidance for Industry. US Dep Heal Hum Serv. 2015;
 51. Holt LJ, Looby A. Factors that Differentiate Prescription Stimulant Misusers from those At-Risk for Misuse : Expectancies , Perceived Safety , and Diversion. *Sust Use Misuse*. 2017;53(7):1068–75.
 52. Faraone S V., Rostain AL, Montano CB, Mason O, Antshel KM, Newcorn JH. Systematic Review: Nonmedical Use of Prescription Stimulants: Risk Factors,

- Outcomes, and Risk Reduction Strategies. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2020;59(1):100–12.
53. Goldstein ER, Ziegenfuss T, Kalman D, Kreider R, Campbell B, Wilborn C, et al. International society of sports nutrition position stand: Caffeine and performance. *J Int Soc Sports Nutr*. 2010;7(5):1–15.
 54. Deventer K, Roels K, Delbeke FT, Eeno P Van. Prevalence of legal and illegal stimulating agents in sports. *Anal Bioanal Chemistry*. 2011;401(2):421–32.
 55. Ambrose PJ, Tsourounis C, Uryasz FD, Patterson E. Characteristics and trends of drug and dietary supplement inquiries by college. *J Am Pharm Assoc Pract Pharm Ed*. 2013;53(3):297–303.
 56. Thevis M, Sigmund G, Scha W, Geyer H. Stimulants and Doping in Sport. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(1):89–105.
 57. King M, Rauch LHG, Brooks SJ, Stein DANJ, Lutz KAI. Methylphenidate Enhances Grip Force and Alters Brain Connectivity. *Med Sci Sport Exerc*. 2017;1(9):1443–51.
 58. Swart J, Lamberts RP, Lambert MI, Gibson ASC, Lambert E V, Skowno J, et al. Exercising with reserve : evidence that the central nervous system regulates prolonged exercise performance. *Br J Sports Med*. 2009;43(1):782–8.
 59. King M, Breda K Van, Rauch LH, Brooks SJ, Stein J, Iperser J. Methylphenidate alters brain connectivity after enhanced physical performance. *Brain Res*. 2017;1679(1):26–32.
 60. Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Rice O, Schiffer WK, Dewey SL. Synergistic interactions between nicotine and cocaine or methylphenidate depend on the dose of dopamine transporter inhibitor. *Synapse*. 2000;38(4):432–7.
 61. Volkow ND, Wang G, Fowler JS, Logan J, Gerasimov M, Maynard L, et al. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. *J Neurosci*. 2001;21(2):1–5.
 62. Carolina R, Cândido F, Perini E, Pádua CM De. Prevalence of and factors associated with the use of methylphenidate for cognitive enhancement among university students. *Einstein*. 2020;18(1):1–7.
 63. McCabe SE, Knight JR, Teter CJ, Wechsler H, McCabe SE. Non-medical use of prescription stimulants among US college students : prevalence and correlates from a national survey. *J Pharm Pract*. 2005;100(1):96–106.
 64. Dupont RL, Coleman JJ, Bucher RH, Wilford BB. Characteristics and Motives of College Students Who Engage in Nonmedical Use of Methylphenidate. *Am J Addict*. 2008;17(1):167–71.
 65. Leblanc-duchin D, Taukulis HK. Chronic oral methylphenidate induces post-treatment impairment in recognition and spatial memory in adult rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2009;91(3):218–25.
 66. Bisagno V, Ferguson D, Luine VN. Chronic D -amphetamine induces sexually dimorphic effects on locomotion , recognition memory , and brain monoamines. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;74(1):859–67.
 67. Block RI, Erwin WJ, Ghoneim MM. Chronic drug use and cognitive impairments. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73(1):491–504.
 68. Vitale K, Getzin A. Nutrition and supplement update for the endurance athlete: Review and recommendations. *Nutrients*. 2019;11(6):1–20.
 69. BRASIL, ANVISA. RDC n.º 18, de 28 de janeiro de 2003. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0018_28_01_2003.html>. Acesso em 24 de abril de 2019. 2003.
 70. BRASIL, ANVISA. Justificativas para os limites mínimos e máximos de

- nutrientes , substâncias bioativas e enzimas da proposta regulatória de suplementos alimentares Gerência-Geral de Alimentos Sumário. 2018;1–36.
71. Gurley BJ, Steelman SC, Thomas SL. Multi-ingredient , Caffeine-Containing Dietary Supplements : History , Safety , and Efficacy. *Clin Ther.* 2014;1–27.
 72. Derlet RW, Tseng JOEC, Albertson TE. Potentiation of Cocaine and d-Amphetamine Toxicity With Caffeine. *Am J Emerg Med.* 1992;10(3).
 73. Namara R, Harkin A. Caffeine provokes adverse interactions with 3 , 4- ‘ ecstasy ’ and related psychostimulants : *Br J Pharmacol.* 2012;167(5):946–59.
 74. Cairns R, Daniels B, Wood DA, Brett J. ADHD medication overdose and misuse: the NSW Poisons Information Centre experience, 2004-2014. *Med J Aust.* 2016;204(4):1–7.
 75. Marel Van Der K, Bouet V, Meerhoff GF, Freret T, Boulouard M, Dauphin F, et al. Effects of long-term methylphenidate treatment in adolescent and adult rats on hippocampal shape, functional connectivity and adult neurogenesis. *Neuroscience [Internet].* 2015;309:243–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.044>
 76. Arnold KE, Boxall ABA, Brown AR, Cuthbert RJ, Gaw S, Thomas H, et al. Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems. *Biol Lett.* 2013;9(1–5).
 77. Liu L, Wu W, Zhang J, Lv P, Xu L, Yan Y. *Acta Ecologica Sinica* Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Acta Ecol Sin.* 2018;38(1):36–41.
 78. Endres HC, da Rosa JG, Kabaselle C, Barcellos HH, Bertol CD, Gil Barcellos LJ, et al. First evidence that waterborne methylphenidate alters endocrine and behavioral stress responses in zebrafish. *Neurosci Lett.* 2017;650:114–7.
 79. Frizzo IB, Koakoski G, Maffi VC, Barcellos LJG, Rossato-grando LG. Chronic exposure to methylphenidate contaminated water elicits social impairment to zebrafish. Artigo submetido. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2020;
 80. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev.* 2008;83(1):13–34.
 81. Saverino C, Gerlai R. The social zebrafish : Behavioral responses to conspecific , heterospecific , and computer animated fish. *Behav Brain Res J.* 2008;191(1):77–87.
 82. Cappelletti S, Piacentino D, Fineschi V, Frati P, Cipolloni L, Aromatario A. Caffeine-Related Deaths : Manner of Deaths and Categories at Risk. *Nutrients.* 2018;10(1):1–13.
 83. Neves DB da J, Caldas ED. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* 2017;105:194–202.
 84. Bloomer RJ, Farney TM, Harvey IC, Alleman RJ. Safety profile of caffeine and 1,3-dimethylamylamine supplementation in healthy men. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(11):1126–36.
 85. Venhuis B, Keizers P, Riel V, Kaste D De. A cocktail of synthetic stimulants found in a dietary supplement associated with serious adverse events. *Drug Test Anal.* 2014;6(6):1–4.
 86. Beauchamp G, Amaducci A, Cook M. Caffeine Toxicity: A Brief Review and Update. *Clin Pediatr Emerg Med [Internet].* 2017;18(3):197–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpem.2017.07.002>
 87. Lystrup LRM, Mc U, Leggit COLJC. Caffeine Toxicity Due to Supplement Use in Caffeine — Naïve Individual : A Cautionary Tale. *Mil Med.* 2015;180(8):936–

- 40.
88. Goldfarb M, Tellier C, Thanassoulis G. Review of Published Cases of Adverse Cardiovascular Events After Ingestion of Energy Drinks. *Am J Cardiol*. 2014;113(1):168–72.
 89. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(3):83–104.
 90. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189(1–2):41–54.
 91. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. *Sci Res*. 2007;1:851.
 92. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic process. 2000;4:339–45.
 93. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem*. 1959;82(1):70–7.
 94. Wang Y, Marsden PA. wang. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1995;4:12–22.
 95. Dalle-donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *TRENDS Mol Med*. 2003;9(4):169–76.
 96. Motaghinejad M, Motevalian M, Shabad B. Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. *Neurosci Lett*. 2015;106–13.
 97. Baldissera MD, Souza CF, Descovi SN, Petrolli TG, da Silva AS, Baldisserotto B. A caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and prevents oxidative damage in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to hypoxia. *Fish Physiol Biochem*. 2019;45(3):1041–9.
 98. Oakes H V, Ketchem S, Hall AN, Ensley T, Archibald KM, Pond BB. Chronic methylphenidate induces increased quinone production and subsequent depletion of the antioxidant glutathione in the striatum. *Pharmacol Reports*. 2019;71(6):1289–92.
 99. Donne-Dalle I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):389–406.
 100. Vanaja P, Perumal E. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *Indian J Med Res*. 2011;133(5):471–8.
 101. Martins M, Reinke A, Petronilho F, Gomes K, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Res*. 2006 Mar;1078(1):189–97.
 102. Ullah F, Ali T, Kim MO. Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. *Neurochem Int* [Internet]. 2015;1:1–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.001>
 103. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine : Friend or foe ? *Pharmacol Ther*. 2006;111(1):877–92.
 104. Vignoli JA, Bassoli DG, Benassi MT. Antioxidant activity , polyphenols , caffeine and melanoidins in soluble coffee : The influence of processing conditions and raw material. *Food Chem*. 2011;124(3):863–8.
 105. Olcina GJ, Timón R, Mu D, Maynar JI, Caballero MJ, Maynar M. Caffeine ingestion effects on oxidative stress in a steady-state test at 75 % VO₂ max. *Sci Sports*. 2008;23(1):87–90.
 106. Yadav A, Janain A, Swarnkar H. Nicotine and caffeine induces oxidative stress in young, adult and rat blood. *J os Cell Tissue Res*. 2010;10(1):2051–6.
 107. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica Ilustrada*. 3 ed. Artmed, editor.

- Porto Alegre; 2006.
108. Janssen RJRJ, Nijtmans LG, Heuvel LP Van Den, Smeitink JAM. Mitochondrial complex I : Structure , function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 2006;4:499–515.
 109. Fagundes A, Aguiar M, Aguiar C, Scaini G, Sachet M, Bernhardt N, et al. Effect of acute and chronic administration of methylphenidate on mitochondrial respiratory chain in the brain of young rats. *Neurochem Res.* 2010 Nov;35(11):1675–80.
 110. Souza M, Mota B, Rosa R, Silva F, Castro M, Rechia M, et al. Neurochemistry International Antioxidant activity elicited by low dose of caffeine attenuates pentylentetrazol-induced seizures and oxidative damage in rats. *Neurochem Int.* 2013;62(6):821–30.
 111. Gonçalves DF, Carvalho NR De, Leite MB, Courtes AA, Hartmann DD, Stefanello ST, et al. Caff and acetaminophen association : E f f e c t s on mitochondrial bioenergetics. *Life Sci.* 2018;193:234–41.
 112. Belous A, Wakata A, Knox CD, Nicoud IB, Pierce J, Anderson CD, et al. Mitochondrial P2Y-Like Receptors Link Cytosolic Adenosine Nucleotides to Mitochondrial Calcium Uptake. *J Cell Biochem.* 2004;92:1062–73.
 113. Belous AE, Jones CM, Wakata A, Knox CD, Nicoud IB, Pierce J, et al. Mitochondrial Calcium Transport is Regulated by. *J Cell Biochem.* 2006;99:1165–74.
 114. Bernardi P. Mitochondrial Transport of Cations : Channels , Exchangers , and Permeability Transition. *Physiol Rev.* 2018;79(4):1127–55.
 115. Kalueff A V. The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish. *The Rights and Wrongs of Zebrafish: Behavioral Phenotyping of Zebrafish.* 2017. 1–317 p.
 116. Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol.* 2006;8(4):329–45.
 117. Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool : the how , why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(504–512).
 118. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Bertholt C, MUFFATO M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496:498–503.
 119. Zon LI. Zebrafish : A New Model for Human Disease. *Genome Res.* 1999;10(3):99–100.
 120. Santos LC, Oliveira JR, Oliveira JJ, Silva PF, Luchiari AC. Irish coffee: Effects of alcohol and caffeine on object discrimination in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016;143:34–43.
 121. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res J.* 2009;205(1):38–44.